

Y.S.CHANG & ASSOCIATES

K.P.O.BOX 136, SEOUL 110, KOREA

Member : AIPPI APAA & LES
Fax : (82-2) 556-5377 / 5969
Phone : 556-8224 / 568-0461
Telex : 24928 (YSCHANG)

FILE COPY

提出書類写本

Kind of protection : PATENT

Applicant : NOVO NORDISK A/S

Title : Lipase Variants

Encl	Document filed	Filing Date	Kor. Appl. No.
X	Application 出願書	March 13, 1993	93-700773
	Petition for Exam 出願審査請求書		
X	Power of Attorney 委任状	"	"
	Priority Document 優先権主張書類		
	Argument 意見書		
X	Amendment 補正書	"	"
	Printed Matter 審査参考資料		
	Appeal 抗告審判請求書		
Your Ref.No.		3520.204-KR, Lias/ENU	
Our Ref.No.		DK-3P-0239	

張龍植特許法律事務所
韓國 Seoul 光化門郵通局私書函136号

BEST AVAILABLE COPY

NZAS-0024420

97

TRANSLATION

Please be advised that the following Application Number has been assigned to this case by the Korean Industrial Property Office as below :

NOTICE OF APPLICATION NUMBER

TO : Y.S.Chang, Attorney
 Appln. Date : Sept. 13, 1991
 Applicant : Novo Nordisk A/S
 Filing date of the Translation : Mar. 13, 1993
 Date: Mar. 17, 1993
 Appln. No.: KPA No. 93-700773
 Request for Exam.: (yes, no)
 Commissioner
 Korean Industrial Property Office

Remarks

- (Order of Examinations) Patent or Utility Model applications shall be examined in the order of the date Requesting Examination with the examination initiated only by formal Request. Design or trademark applications are automatically examined according to the filing dates.
- (Request for Examination) The application shall be deemed withdrawn if the formal Request (Form No. 24 of the Patent Law Regulations) is not filed within 5 years of the Korean filing date for patents and 3 years for utility models.

Case	Official Fees for Requests for Examination
Patent Application	Basic fee : US\$86.00, Additional fee for each claim in excess of one(1) : US\$15.00
Utility Model Application	Basic fee : US\$40.00, Additional fee for each claim in excess of one(1) : US\$8.00

- (Recordal of Changes) When the address or name of the applicant is changed, a request for recording the change (Form No. 4 of the Patent Law Regulations) must be immediately filed with the Korean Industrial Property Office.
- (Payment of Official Fees) Payment of application or registration fees, etc. shall be made at any Korean National Treasury Bank in the official form required by then Korea Industrial Property Office; one of the receipts issued by the bank should be attached to the relevant documents. Alternatively, a Postal Money Order in the required amount may replace the bank payment and receipt.
- (Reference) For questions, please contact the Inquiry Department (Tel. 568-8150/64) or Application Department (Tel. 568-6079) of the Korea Industrial Property Office.
- (Address of then Korea Industrial Property Office) 823-1 Yeoksam-dong, Kangnam-ku, Seoul, 135-784, Korea.

出願番號通知書

翻譯文

출 원 번호 통 지 서	관인생략	출원번호통지서	Official Filing Certificate
	우편엽서	135-0000	93 3 17
받는 사람 (대리인) 장용식			
주 소 서울시 강남구역삼동 824-20 삼성빌딩			
출원일자 : 1993년 3월 13일 심사청구 (무)			
번역문제출일자 : 93년 3월 13일			
출원번호 : 1993년 특허출원 제 700773호			
출원인 노보노르디스크아크티에셀스카브			
특 허 청 장			
※ 이면 참조			

TRANSLATION

PAPER PURSUANT TO ARTICLES 201 and 203 OF THE KOREAN PATENT LAW			
Applicant	Novo Nordisk A/S Novo Alle DK-2880 Bagsvaerd Denmark		
Attorney	D. S. Lee Y. S. Chang	Code of Attorney	H359 K020
Inventor(s)	SVENDSEN, Allan Bakkeledet 28 3460 Birkerod Denmark CLAUSEN, Ib Groth Ordrup Jagtvej 153, st. tv. 2920 Charlottenlund Denmark PATKAR, Shankant Anant Christoffers Allé 91 2800 Lyngby Denmark GORMSEN, Erik Snekketoften 15 2830 Virum Denmark		
Title of Invention	Lipase Variants		
International Appln. Number	PCT/DK91/00271	International Filing Date	Sept. 13, 1991

NZAS-0024422

TRANSLATION

Priority claim pursuant to Art. 54 of the Patent Law	Country	Kind of Appln.	Filing Date	Appln. No.	Certified Document	
					attached	not attached
	Denmark	Patent	Sept.13.1990	2194/90		0
	Denmark	Patent	Sept.13.1990	2195/90		0
	Denmark	Patent	Sept.13.1990	2196/90		0

We are filing this document pursuant to Articles 201 and 203 of the Korean Patent Law.

Mar. 13, 1993

Y. S. Chang
Patent Attorney

D. S. Lee
Patent Attorney

To : Commissioner
Korea Industrial Property Office

Attached Documents :

1. PAPER and Translation of Specification, Claims, Abstract and Drawings
Each 3 copies
2. Power of Attorney with Translation
Each 1 copy
3. Translation of Priority Document (will be filed)

특허법 제201조 및 제203의 규정에 의한 서면							
접수 이관				출원번호			
				담 당		심 사 관	
출원인	성 명	노보 노르디스크 아크티에 셀스카브 대표자 안네 제케르				국적	덴마크
	주 소	덴마크 디케이-2880 박스베르트 노보알레					
대리인	성 명	변리사 장 용 식 변리사 이 대 선			대리인코드	K020 H359	
	주 소	서울특별시 강남구 역삼동 824-20 (전화번호 : 556-8224 ~6)					
발명자	성 명	스벤드센 알란				국적	덴마크
	주 소	덴마크 디케이-3460 버어커외트 박케레테르 28					
	성 명	클라우젠 입 그로트				국적	덴마크
	주 소	덴마크 디케이-2920 살롯덴룬트 에스티. 티브이. 오르트롭 야그트베이 153					
	성 명	파트카아 삼칸트 아난트				국적	덴마크
	주 소	덴마크 디케이-2800 링비 크리스토퍼스 알레 91					
	성 명	고름센 에릭				국적	덴마크
	주 소	덴마크 디케이-2830 비룸 스넥케토프텐 15					
발명의 명칭		리파제 변체					
국제출원번호		PCT/DK91/00271		국제출원일		1991. 9. 13	
특허법 제54조 제55조의 규정에 의한 특허청 주장	출원 국명	출원 종류	출원 일자	출원 번호	증명서류		
					첨부	미첨부	
	덴마크	특허	1990.9.13	2194/90		0	
	덴마크	특허	1990.9.13	2195/90		0	
	덴마크	특허	1990.9.13	2196/90		0	
<p>특허법 제 201조 및 동법 제 203조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합니다.</p> <p>1993년 3월 13일</p> <p>대리인 변리사 장 용 식</p> <p>대리인 변리사 이 대 선</p> <p>특 허 청 장 귀하</p>							
<p>첨부서류</p> <p>1. 서면, 명세서번역문, 특허청구의 범위번역문, 요약서번역문, 각 3통</p> <p>2. 도면, 변형예시, 동번역문, 동번역문 (추후제출) 각 1통</p> <p>3. 우편송신서</p>							

서울 江南區 驛三洞 824-20 (裕慶빌딩)

張龍植特許法律事務所

수수료계산서

1. 출원료수수료계산서

구 분	총면수	내 역	면 수	금 액 (원)
1. 명세서	64	기본면수	20	15,000
2. 도 면	9	가산면수	53	26,500
계	73	계	73	41,500

2. 우선권주장료

우선권주장건수	3건	35,000원
---------	----	---------

3. 심사청구료

청구항	항 수	내 역	항 수	금 액 (원)
최종항		기본항 (독립항 1항)		
독립항		가산항수		
종속항		합 계		

4. 수수료합계

합 계	금 액 (원)
1 + 2항	76,500

지정국 (지역 또는 국가) 현황

지역 특허

- ☒ EP 유럽 특허 : AT 오스트리아, BE 벨기에, CH and LI 스위스, 리히텐슈타인, DE 서독, DK 덴마크, ES 스페인, FR 불란서, GB 영국, IT 이태리, LU 룩셈부르크, NL 네덜란드, SE 스웨덴, GR 그리스

이 서식 시행후 PCT 계약국이 된 EPO 계약국은 다음에 기재하시오.

- ☐ OA OAPI 특허 : 베냉 Benin, 브르키나파소 Burkina Faso, 카메룬 Cameroon, 중앙아프리카, Central African Republic, 차드 Chad, 콩고 Congo, 가봉 Gabon, 말리 Mali 모리타니 Mauritania, 세네갈 Senegal, 토고 Togo.

이 서식 시행후 PCT 계약국이된 OAPI 계약국 : 타 OAPI 보호를 희망하는 경우에는 점선위에 기재하시오 : (3)

국내특허 (해당하는 경우에는 타종류의 보호 또는 취급을 명시 3)

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> AT 오스트리아 Austria 3 | <input checked="" type="checkbox"/> KR 대한민국 Republic of Korea 3 |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU 호주 Australia 3 | <input type="checkbox"/> KP 북한 Democratic People's Republic of Korea 3 |
| <input type="checkbox"/> BB 바베이도스 Barbados | <input type="checkbox"/> LK 스리랑카 Sri Lanka 3 |
| <input type="checkbox"/> BG 불가리아 Bulgaria 3 | <input type="checkbox"/> LU 룩셈부르크 Luxembourg 3 |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR 브라질 Brazil 3 | <input type="checkbox"/> MC 모나코 Monaco 3 |
| <input type="checkbox"/> CH and LI 스위스, 리히텐슈타인 Switzerland, Liechtenstein | <input type="checkbox"/> MG 마다가스카 Madagascar 3 |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA 캐나다 Canada | <input type="checkbox"/> MW 말라위 Malawi 3 |
| <input type="checkbox"/> DE 서독 Germany 3 | <input type="checkbox"/> NL 네덜란드 Netherlands 3 |
| <input type="checkbox"/> DK 덴마크 Denmark | <input type="checkbox"/> NO 노르웨이 Norway 3 |
| <input type="checkbox"/> ES 스페인 Spain 3 | <input type="checkbox"/> RO 루마니아 Romania 3 |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI 핀란드 Finland 3 | <input type="checkbox"/> SD 수단 Sudan 3 |
| <input type="checkbox"/> GB 영국 United Kingdom | <input type="checkbox"/> SE 스웨덴 Sweden 3 |
| <input type="checkbox"/> HU 헝가리 Hungary | <input type="checkbox"/> SU 소련 Soviet union 3 |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP 일본 Japan 3 | <input checked="" type="checkbox"/> US 미국 United States of America 3 |

이 서식 시행후 PCT 계약국이된 국가를 지정 (국내특허의 목적) 하는 경우에는 다음에 기재하시오.

명 세 서

리파제 변체

도면의 간단한 설명

본발명은 첨부된 도면에 관하여 하기에서 기술된다.

제1A 및 B도는 리파제가 각기 불활성(A) 및 활성(B) 형태일때 H. lanuginosa 리파제의 지질접촉부의 3-차원 구조를 나타내는 컴퓨터 모델이다.

"백색" 잔기는 소수성 아미노산(Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Gly 및 Met) 을 나타내고, "황색" 잔기는 친수성 아미노산(Thr, Ser, Gln, Asn, Tyr 및 Cys) 을 나타내고, "청색" 잔기는 양전하 아미노산(Lys, Arg 및 His)을 나타내고, 및 "적색" 잔기는 음전하 아미노산(Glu 및 Asp) 을 나타낸다.

제2A 및 2B도는 리파제가 각기 불활성(A) 및 활성(B) 형태일때 Rh. miehei 리파제의 지질접촉부의 3-차원 구조를 나타내는 컴퓨터 모델이다.

"백색" 잔기는 소수성 아미노산(Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Gly 및 Met) 을 나타내고, "황색" 잔기는 친수성 아미노산(Thr, Ser, Gln, Asn, Tyr 및 Cys)을 나타내고, "청색" 잔기는 양전하 아미노산(Lys, Arg 및 His)을 나타내고, 및 "적색" 잔기는 음전하 아미노산(Glu 및 Asp) 을 나타낸다.

제 3도는 중합효소 사슬반응(PCR) 에 의한 리파제 변체(variant) 를 암호화 하는 플라스미드 제조의 도식적인 표현이다.

제 4도는 PCR 에 의한 3-단계 돌연변이 유발의 도식적인 표현이다.

제 5도는 플라스미드 pAG1의 제한지도(restriction map) 이다.

제 6도는 플라스미드 pAHL의 제한지도이다.

제 7도는 플라스미드 pARML의 제한지도이다.

발명의 분야

본발명은 개선된 성질을 가지는 새로운 리파제 효소변체, 상기 변체의 발현을 암호화하는 DNA 구조체, DNA 구조체에서 변체를 발현할 수 있는 숙주세포, 뿐만아니라 상기 숙주세포를 배양함으로써 변체를 제조하는 방법에 관련된다.

발명의 배경

제조합 DNA 기술의 출현 및 발달은 단백질 화학분야에 깊은 영향을 주었다. 이 기술은 특이적인 기준에 따라 효소 따위의 단백질 및 펩티드를 고안할 수 있게 하여 원하는 성질을 갖는 화합물의 생성을 가능하게 하는 것이 고려되었다. 그러한 기술의 이용성 때문에 원하는 아미노산 서열을 갖는 효소를 구성하는 것이 가능해졌고 이 목적에 대한 상당한 연구가 행하여졌다.

많은 리파제의 일차구조가 결정되어 문헌에 기술되었다 (Boel 등, Lipids 23, 701-706 (1988), de Caro 등, Biochim. Biophys. Acta 671, 129-138 (1981), Winkler 등, Nature 343, 771-774 (1990)). 더욱이 또한 보다 제한된 수의 리파제의 삼차구조가 밝혀졌다 (Winkler 등, Nature 343, 771-774 (1990), Brady 등, Nature 343, 767-770 (1990) J. D. Schrag 등, Nature 351, 1991, pp. 761-764).

이러한 연구로 부터 리파제는 어떤 구조적 특징을 공유하는것 같지만 한편으로는 주요 구조적 변이가 리파제 사이에 존재하는 것으로 나타났다.

발명의 요약

수많은 연구는 개선된 성질을 나타내는 리파제 변체를 얻기 위하여 특이적인

리파제를 발현하는 DNA 서열에서 하나 이상의 특이적인 돌연변이에 의하여 개선된 성질의 리파제가 얻어질 수 있다는 것을 나타냈다.

결과적으로 본발명의 한면은 리파제 분자의 우세하게 소수성이고 연장된 결합포켓 내에 위치한 활성 세린을 포함하는 트립신- 같은 촉매 3체 (catalytic triad)를 함유하는 모(母) 리파제의 리파제 변체에 관련되는데, 여기서 모 리파제의 지질 접촉 부의 정전기적 전하 및/ 또는 소수성은 하나 이상의 음전하 아미노산 잔기를 중성의 또는 양전하의 아미노산 잔기(들)에 의해 치환 또는 삭제함으로써, 및/ 또는 하나 이상의 중성의 아미노산 잔기를 양전하의 아미노산 잔기(들)에 의해 치환함으로써, 및/ 또는 하나 이상의 친수성 아미노산 잔기를 소수성 아미노산 잔기(들)에 의해 치환 또는 삭제함으로써 변화된다.

편의상 이 리파제 변체를 하기에서는 리파제 변체 I이라고 명명한다.

본 명세서에서는 "트립신- 같은"이란 용어는 모 리파제가 트립신의 것에 해당하는 활성부위의 촉매 3체, 즉 아미노산 Ser, His 및 나머지 하나는 Asp, Glu, Asn 또는 Gln 중 하나인 것을 함유하는 것을 나타내도록 의도된다.

일부 리파제는 또한 리파제가 불활성 형태일때 활성세린을 덮는 표면고리 구조를 포함할 수 있다 (이러한 리파제의 실례가 Brady 등, Nature 343, 1990, pp. 767-770 에 기술되어 있다). 리파제가 활성화될때, 고리구조는 활성부위 잔기를 노출하도록 이동되어 증가된 표면소수성을 갖는 표면을 생성하여 가수분해시 또는 가수분해 동안 지질기질과 상호작용하게 된다.

본 목적을 위하여 이러한 표면을 "지질접촉부"라고 명명하고, 내부에 위치한 아미노산 잔기 또는 이 표면의 형성부분(또는 그러한 고리구조를 포함하지 않는 리파제의 대응표면)을 포함하도록 의도된다.

이 문장들은 리파제가 지질표면과의 접촉에 의하여 활성화될때 지질층으로 부딪

트리글리세리드를 가수분해하는 가수분해시 또는 가수분해 동안 기질과의 리파제 상호작용에 참여할 수 있다. 트리글리세리드의 가수분해 동안 지방산 및 모노- 및 디-글리세리드가 다양한 양으로 형성된다.

지질접촉부에서 리파제를 돌연변이시킴으로써 지질접촉부의 정전기적 전하 및/또는 소수성을 변화시키는 한가지 이유는 가수분해 동안 형성되는 지방산이 지질층에 남게되어 음전하 표면을 형성할 수 있다는 것이다.

리파제가 세척 목적을 위해 사용될 때에는 음전하 세정제가 지질표면상에 음전하를 형성할 수 있다. 그리하여 덜 음전하성이고 및/또는 더 소수성인 리파제 변체를 제조함으로써 다른 특이성 및/또는 개선된 성질을 가지는 리파제를 얻는 것이 가능할 수 있다.

본발명의 다른 면은 리파제 분자의 우세하게 소수성인 연장된 결합포켓내에 위치한 활성세린을 포함하는 트립신-같은 촉매 3체를 함유하는 리파제 변체에서, 상기 리파제 변체가 지질접촉부의 표면구조를 변화시키기 위해서 가수분해시 또는 가수분해 동안 기질과의 상호작용에 참여하는 활성세린 잔기를 포함하는 리파제 구조 부분내에 위치한 잔기들을 함유하는 지질접촉부 표면을 구성하는 하나 이상의 아미노산 잔기 위치에 하나 이상의 아미노산 잔기가 삽입, 삭제 또는 치환된 것을 특징으로 하는 리파제 변체에 관련된다.

리파제 분자의 그러한 표면변경의 목적은 리파제 활성부위의 지질기질에 대한 개선된 접근성을 제공하는 것이다. 편의상 이 리파제 변체를 하기에서는 리파제 변체 II라고 명명한다.

본발명의 또다른 면은 (i) 리파제 분자의 우세하게 소수성인 연장된 결합포켓내에 위치한 활성세린을 포함하는 트립신-같은 촉매 3체 및 (ii) 리파제가 불활성 형태일 때 활성세린을 덮고 활성세린을 지질기질에 접근가능하게 만들기 위해 리파제가

활성화될때 구조를 변화시키는 표면고리 구조로 이루어지는 유형의 리파제 변체로서, 고리구조는 결합포켓에 면한 우세하게 소수성인 내표면과 우세하게 친수성인 외부 표면을 가지며, 상기의 리파제 변체는 가수분해시 또는 가수분해 동안 기질과의 상호작용 또는 표면고리구조의 이동에 참여하는 활성세린 잔기를 포함하는 리파제 구조부분내에 위치한 잔기들을 함유하는 지질접촉부 서열을 구성하는 및/ 또는 고리 구조 서열을 구성하는 하나 이상의 아미노산 잔기 위치에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 삭제, 치환 또는 삽입된 것을 특징으로 하는 리파제 변체에 관련된다.

이것은 고리구조를 보다 개방되게 하여 활성세린이 기질에 보다 접근할 수 있게 된다. 편의상 이 리파제 변체를 하기에서 리파제 변체 III이라고 명명한다.

본발명은 또한 상기에서 지정한 대로 리파제 변체를 암호화하는 DNA 서열을 함유 하는 DNA 구조체, 상기 DNA 구조체를 운반하는 제조함 발현벡터, DNA 구조체 또는 발현 벡터로 형질전환된 세포, 뿐만아니라 리파제 변체 생성에 공헌하는 조건에서 상기 세포를 배양 또는 생장시킨 후 배양물에서 리파제 변체를 회수함으로써 본 발명의 리파제 변체를 제조하는 방법에도 관련된다.

본발명은 더우기 본발명의 리파제 변체를 함유하는 세정제 조성물 뿐만아니라 선택적으로 비-살포성 과립, 안정화된 액체 또는 보호된 효소형태로 본발명의 리파 제 변체를 함유하는 세정제 첨가물에도 관련된다.

발명의 상세한 개시

본 명세서에서는 하기의 표기가 사용된다:

A = Ala = 알라닌

V = Val = 발린

L = Leu = 류신

I = Ile = 이소류신

P = Pro = 프롤린

F = Phe = 페닐알라닌

W = Trp = 트립토판

M = Met = 메티오닌

G = Gly = 글리신

S = Ser = 세린

T = Thr = 트레오닌

C = Cys = 시스테인

Y = Tyr = 티로신

N = Asn = 아스파라긴

Q = Gln = 글루타민

D = Asp = 아스파르트산

E = Glu = 글루탐산

K = Lys = 리신

R = Arg = 아르기닌

H = His = 히스티딘

본발명에 따라 리파제 변체를 기술할때 참조의 편의를 위해 하기의 명명법이

이용되었다:

본래의 아미노산(들): 위치(들): 치환된 아미노산(들)

이 명명법에 따라 예컨대 위치 195의 글리신을 글루탐산으로 치환한 것은 다음과

같이 나타내진다:

Gly 195 Glu 또는 G195E

똑같은 위치의 글리신의 삭제는 다음과 같이 나타내진다:

Gly 195 * 또는 G195*

리신 따위의 부가적인 아미노산 잔기의 삽입은 다음과 같다:

Gly 195 GlyLys 또는 G195GK

특이적인 리파제가 다른 리파제와 비교하여 "삭제"를 포함하고 그러한 위치에 삽입이 행하여진 것은 다음과 같이 나타내진다:

위치 36에서 아스파르트산이 삽입되었으면 * 36 Asp 또는 *36D

다수의 돌연변이는 +에 의해 분리되었다. 즉: Arg 170 Tyr + Gly 195 Glu 또는 R170Y + G195E는 위치 170 및 195에서의 돌연변이가 각기 아르기닌과 글리신을 티로신과 글루탐산으로 치환한 것을 나타낸다.

본발명에 따라 리파제 변체 I는 아마도 리파제의 지질 접촉부의 하나 이상의 글루탐산 또는 아스파르트산 잔기가 글루타민, 아스파라긴, 알라닌, 류신, 발린, 세틴, 트레오닌, 리신, 또는 아르기닌에 의해 치환된 것이다.

모 리파제는 포유동물의 리파제, 예컨대 췌장, 위장, 간장 또는 리포단백질 리파제 따위의 다양한 공급원에서 추출될 수 있지만, 일반적으로는 그것이 미생물의 리파제인 것이 바람직하다. 그것으로서 모 리파제는 효모 예컨대 Candida 리파제,

세균 예컨대 Pseudomonas 리파제 또는 곰팡이 예컨대 Humicola 또는 Rhizomucor

리파제로 부터 선택될 수 있다. 구조적으로 상동인 리파제의 군으로 부터 모 리파제를 선택하는 것이 특히 바람직하다.

본발명의 리파제 변체 I의 바람직한 구체예에서는 모 리파제가 Rhizomucor miehei 리파제, 특히 EP 305 216에서 기술된 리파제이다.

이 구체예에서는 하나 이상의 음전하 아미노산 잔기가 다음과 같이 하나 이상의 양전하 또는 중성 아미노산 잔기에 의하여 치환될 수 있다.

D91N, K, R, A, V, L, S, T;
 D256N, K, R, A, V, L, S, T;
 D226N, K, R, A, V, L, S, T;
 D61N, K, R, A, V, L, S, T;
 D113N, K, R, A, V, L, S, T;
 E201Q, K, R, A, V, L, S, T;
 D243N, K, R, A, V, L, S, T.

본발명의 리파제 변체 I의 다른 바람직한 구체예에서는, 모 리파제가 Humicola

lanuginosa 리파제, 특히 H. lanuginosa 균주 DSM 4106에 의해 생성되는 리파제이다

(EP 258 068 참조). 이 구체예에서는 하나 이상의 음전하 아미노산 잔기가

다음과 같이 하나 이상의 중성 또는 양전하 아미노산 잔기에 의해 치환될 수

있다:

E87Q, K, R, A, N, T, S, L, V;
 D254N, K, R, A, Q, T, S, L, V;
 D242N, K, R, A, Q, T, S, L, V;
 E210Q, K, R, A, N, T, S, L, V;
 E56Q, K, R, A, N, T, S, L, V;
 D96N, K, R, A, Q, T, S, L, V;
 D111N, K, R, A, Q, T, S, L, V;
 D62A, Q, N, T, S, K, R, L, V;
 E219A, Q, N, T, S, K, R, L, V;
 E234A, Q, N, T, S, K, R, L, V;
 E57A, Q, N, T, S, K, R, L, V;
 E99A, Q, N, T, S, K, R, L, V;
 D27A, Q, N, T, S, K, R, L, V; 또는
 E239A, Q, N, T, S, K, R, L, V.

본발명에 따른 특히 바람직한 치환체는 다음과 같다.

E87Q + D254N + D242N + E210Q;
 E87Q + D254N + E210Q;
 D96N + E87Q + D254N;
 R209A + E210A.

한편 하나 이상의 중성아미노산 잔기가 다음과 같이 하나 이상의 양전하 아미노산

잔기에 의하여 치환될 수 있다:

T267K, R;
 S85K, R;
 T226K, R;
 N88K, R;
 N92K, R;

I255K,R;
I202K,R
L206K,R;
L259K,R;
V203K,R; 또는
L227K,R

Humicola lanuginosa 리파제와 Rhizomucor miehei 리파제는 똑같은 리파제 군에 속한다

는 것이 주지되어야 한다.

이것은 두 리파제의 전체 3-차원 구조가 매우 유사하다는 것을 의미하며 X-선 결정학에 의해 매우 상동적이라는 것이 나타내졌다 (H. lanuginosa 및 Rh. miehei

리파제의 컴퓨터 모델이 각기 제1A 및 B 그리고 2A 및 B도에서 보여지며, 그것으로부터 두 리파제의 지질접촉부 사이의 유사성이 명백하다).

따라서 아마도 각 리파제에 대해 나타내진 유형의 변형은 다른 리파제에 대해서도 또한 기능적일 것이다.

리파제 변체 II의 한 구체에에서는 하나 이상의 아미노산 잔기가 하나 이상의 다른 부위가 더 작은 아미노산 잔기에 의해 치환될 수 있다.

그러한 변형의 목적은 리파제의 활성부위를 노출시켜서 기질과의 접촉에 보다 이용되기 쉽게 만든다. 특히 부피가 더 작은 아미노산 잔기는 발린, 트레오닌, 세린, 글리신 또는 알라닌에서 선택될 수 있다.

리파제 변체 II의 모 리파제는 포유동물의 리파제 예컨대 췌장, 위장, 간장 또는 리포단백질 리파제 따위의 다양한 공급원에서 추출될 수 있지만, 일반적으로는 그것이 미생물의 리파제인 것이 바람직하다.

그것으로서 모 리파제는 효모 예컨대 Candida 리파제, 세균 예컨대 Pseudomonas 리파제 또는 곰팡이 예컨대 Humicola 또는 Rhizomucor 리파제로 부터 선택될 수 있다.

I255K,R;
I202K,R
L206K,R;
L259K,R;
V203K,R; 또는
L227K,R

Humicola lanuginosa 리파제와 Rhizomucor miehei 리파제는 똑같은 리파제 군에 속한다

는 것이 주지되어야 한다.

이것은 두 리파제의 전체 3-차원 구조가 매우 유사하다는 것을 의미하며 X-선 결정학에 의해 매우 상동적이라는 것이 나타내졌다 (H. lanuginosa 및 Rh. miehei

리파제의 컴퓨터 모델이 각기 제1A 및 B 그리고 2A 및 B도에서 보여지며, 그것으로부터 두 리파제의 지질접촉부 사이의 유사성이 명백하다).

따라서 아마도 각 리파제에 대해 나타내진 유형의 변형은 다른 리파제에 대해서도 또한 기능적일 것이다.

리파제 변체 II의 한 구체에에서는 하나 이상의 아미노산 잔기가 하나 이상의 다른 부위가 더 작은 아미노산 잔기에 의해 치환될 수 있다.

그러한 변형의 목적은 리파제의 활성부위를 노출시켜서 기질과의 접촉에 보다 이용되기 쉽게 만든다. 특히 부피가 더 작은 아미노산 잔기는 발린, 트레오닌, 세린, 글리신 또는 알라닌에서 선택될 수 있다.

리파제 변체 II의 모 리파제는 포유동물의 리파제 예컨대 췌장, 위장, 간장 또는 리포단백질 리파제 따위의 다양한 공급원에서 추출될 수 있지만, 일반적으로는 그것이 미생물의 리파제인 것이 바람직하다.

그것으로서 모 리파제는 효모 예컨대 Candida 리파제, 세균 예컨대 Pseudomonas 리파

제 또는 곰팡이 예컨대 Humicola 또는 Rhizomucor 리파제로 부터 선택될 수 있다.

예컨대, 모 리파제가 상기에서 언급한 Rhizomucor miehei 리파제 일때, 하기의 치환
이 바람직하게는 행해질 수 있다.

I204V, A, T, S, G;
L208V, A, T, S, G;
F213V, A, T, S, G; 또는
I254V, A, T, S, G.

모 리파제가 상기에서 언급한 Humicola lanuginosa 리파제일때, 하기의 치환이 바람직
하게는 행해질 수 있다.

I202V, A, T, S, G;
L206V, A, T, S, G;
F211V, A, T, S, G, I; 또는
I255V, A, T, S, G.

리파제 변체 II가 하나 이상의 표면고리 서열을 갖는 것일때, 고리서열 부분을
형성하는 하나 이상의 아미노산 잔기가 유용하게 삭제될 수 있다.

그러한 변형의 목적은 활성세린의 기질에 대한 접근가능성을 개선하는 것이다.

이 목적으로 고리서열로 부터 2-8, 특히 2-6 아미노산 잔기를 삭제하는 것이
편리하다는 것이 발견되었다.

예컨대 모 리파제가 상기에서 언급한 Rhizomucor miehei 리파제일때, 다음 위치중

하나 이상에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 삭제될 수 있다:

82-113, 211-215, 235-243, 245-269 또는 264-269.

적당한 삭제(및 언급한 첫 실시예의 경우에는 치환)의 특이적인 실시예는 다음과
같다.

N264* + T265* + G266* + L267* + C268* + T269* + C22T;
F213* + F215*;
D238* + L239* + E240* + D243*; 또는
S247* + F251* + T252*.

모 리파제가 상기에서 언급한 Humicola lanuginosa 리파제일때, 다음 위치중 하나

이상에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 삭제될 수 있다:

84-112, 209-213, 238-245, 247-254 또는 264-269.

적당한 삭제(및 언급한 첫 실시예의 경우에는 치환)의 특이적인 실시예는 다음과 같다.

L264* + I265* + G266* + T267* + C268* + L269* + C22T;
R209* + E210*;
F211* + Y213*;
D242* + E239* + I241; 또는
N247* + D254*.

리파제 변체 II의 특이한 구체예에서, 모 리파제는 리파제가 불활성 형태일때 활성 세린을 덮고 활성세린을 지질기질에 접근 가능하게 하기 위해 리파제가 활성화될때 그것의 구조를 변화시키는 표면고리 구조를 포함한다.

이 고리구조는 결합포켓에 면하는 우세하게 소수성인 내표면 및 우세하게 친수성인 외부표면을 가진다. 이 리파제 변체는 고리구조를 구성하는 서열의 하나 이상의 아미노산 잔기의 삭제를 특징으로 한다.

고리구조는 인간 췌장의 리파제(Winkler 등, Nature 343, 1990, pp. 771-774 참조) 및

Rhizomucor miehei 리파제(Brady 등, Nature 343, 1990, pp. 767-770 참조)에 대해

기술한 것에 대응한다. 그러나 리파제 변체는 바람직하게는 단지 5 아미노산 잔기로 구성되는 보다 짧은 고리구조를 가진다. 고리구조는 부가적으로 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 포함할 수 있다.

그러나 고리구조내에 존재하는 트립토판 잔기(H. lanuginosa 리파제의 W89 및 Rh.

miehei 리파제의 W88)는 보존되어야 한다는 일부 표시가 있다.

리파제 변체 III에서는 고리구조의 적어도 한 아미노산 잔기가 바람직하게는 시스템에 의해 치환되고, 적어도 하나의 다른 아미노산 잔기가 바람직하게는 또한 시스템에 의해 치환되고, 두 시스템 잔기가 이황화물 결합을 형성하도록 서로에 대해 위치된다. 이것은 표면고리구조가 이동하게 하고 그것이 보다 개방되게 하여 활성세린이 기질에 보다 접근하기 쉽게 된다.

예컨대 모 리파제가 상기에서 언급한 Rhizomucor miehei 리파제일때, 다음 치환이 행해질 수 있다.

S114C + A90C;
R86C + D61C;
S84C + D61C;
N87C + D61C;
Y60C + R78C; 또는
Y60C + N87C.

한편 모 리파제가 상기에서 언급한 Humicola lanuginosa 리파제일때, 다음 치환이 행해질 수 있다.

G61C + N88C;
G61C + E87C;
D62C + E87C;
D62C + S85C;
D62C + N88C; 또는
S116C + G91C.

한편 수성배지에서 고리구조의 보다 개방된 형태는 활성세린을 포함하는 측쇄 3개가 위치한 결합포켓의 하나 이상의 덜 친수성인 아미노산 잔기에 의하여 하나 이상의 친수성 아미노산 잔기를 치환함으로써 얻어질 수 있다.

예컨대 모 리파제가 상기에서 언급한 Rhizomucor miehei 리파제일때, 다음 치환이 행해질 수 있다.

I204V, A, T, S, G;
 L208V, A, T, S, G;
 F213V, A, T, S, G;
 I254V, A, T, S, G;
 L255V, A, T, S, G;
 L258V, A, T, S, G;
 L267V, A, T, S, G; 또는
 F94L, T, K.

특히 아미노산 치환이 다음과 같이 결합될 수 있다.

I204T + L255T + L267T; 또는
 L208T + I254T + L258T.

또 리파제가 상기에서 언급한 Humicola lanuginosa 리파제일때, 다음 치환이 행해질 수 있다.

L93V, T, S, A, G;
 I90V, T, S, A, G;
 I86V, T, S, A, G;
 I202V, T, S, A, G;
 L206V, T, S, A, G;
 I255V, T, S, A, G;
 L259V, T, S, A, G;
 F95L, T, K; 또는
 F211L, T, K.

리파제 변체 IV의 바람직한 구체예에서는 하나 이상의 아미노산 잔기가 다음과 같이 치환될 수 있다:

F95K;
 I86T;
 I90T;
 I255T;
 L259T;
 L206T; 또는
 L206T + I255T + L259T

본발명에 따라 리파제 변체 I-III에 대해 상기에서 나타난 아미노산 서열의 변형 중 어느 하나가 상기에서 언급한 다른 변형 중 어느 하나와 결합될 수 있다는 것이 주지되어야 한다.

발명의 리파제 변체의 제조방법

유전자속에 돌연변이를 도입하는 몇가지 방법이 당업계에서 공지되었다.

리파제- 암호화 DNA 서열을 클로닝하는 것에 대해 간단히 기술한 다음, 리파제- 암호화 서열내의 특이적인 부위에서 돌연변이를 일으키는 방법이 기술될 것이다.

리파제를 암호화하는 DNA 서열의 클로닝

모 리파제를 암호화하는 DNA 서열은 문제의 리파제를 생성하는 어떤 세포 또는 미생물로 부터 당업계에서 공지된 다양한 방법에 의해 분리될 수 있다.

먼저 연구할 리파제를 생성하는 생물체로 부터 염색체 DNA 또는 mRNA를 이용하여 게놈 DNA 및/ 또는 cDNA 라이브러리를 구성하여야 한다.

그 다음 리파제의 아미노산 서열이 공지되었으면, 상동이고 표지된 올리고뉴클레오티드 프로브가 합성될 수 있고 세균 DNA 의 게놈라이브러리, 또는 곰팡이 cDNA 라이브러리로 부터 리파제- 암호화 클론을 동정하는데 이용될 수 있다.

한편, 세균 또는 곰팡이의 다른 균주의 리파제에 상동인 서열을 포함하는 표지된 올리고뉴클레오티드 프로브가 혼성화 및 낮은 스트린전시(stringency)의 세척조건을 이용하여 리파제- 암호화 클론을 동정하는 프로브로서 사용될 수 있다.

리파제- 생성 클론을 동정하는 다른 방법은 게놈 DNA 단편을 플라스미드 따위의 발현 벡터 속에 삽입하는것, 결과적인 게놈 DNA 라이브러리로 리파제- 음성 세균을 형질전환하는것, 및 그 다음 리파제용 기질을 포함하는 한천위에 형질전환된 세균을 평판배양하는 것을 포함한다.

리파제- 함유 플라스미드를 포함하는 세균은 분비된 리파제에 의한 기질의 분해 때문에 많은 한천의 후광에 의해 둘러싸인 콜로니를 생성할 것이다.

한편 효소를 암호화하는 DNA 서열은 확립된 표준방법, 예컨대 S.L. Beaucage 및 M.H. Caruthers, Tetrahedron Letters 22, 1981, pp. 1859-1869에서 기술된 포스포아미디트 방법, 또는 Matthes 등, The EMBO J. 3, 1984, pp. 801-805에서 기술된 방법에 의하여 합성적으로 제조될 수 있다.

포스포아미디트 방법에 따라서, 올리고뉴클레오티드가 예컨대 자동 DNA 합성기에서 합성되고, 정제, 어닐링, 결합되고 및 적당한 벡터속에 클로닝된다.

최종적으로, DNA 서열은 혼합된 게놈 및 합성, 혼합된 합성 및 cDNA 또는 혼합된 게놈 및 cDNA 출처를 갖는 것일 수 있는데, 이것은 합성, 게놈 또는 cDNA 출처를 갖는 단편들을 (적당히) 표준기술에 따라 결합시킴으로써 제조되는데 이 단편들은 전체 DNA 서열의 다양한 부분에 해당한다.

DNA 서열은 또한 예컨대 US 4,683,202 또는 R.K. Saiki 등, Science 239, 1988, pp. 487-491 에 기술된 것처럼 특이적인 프라이머를 사용하여 중합효소 사슬반응(PCR)에 의해 제조될 수 있다.

리파제- 암호화 서열의 부위- 방향성 돌연변이유발 (Site-directed mutagenesis)

일단 리파제- 암호화 DNA 서열이 분리되고 바람직한 돌연변이 부위가 확인되면, 합성 올리고뉴클레오티드를 사용하여 돌연변이가 도입될 수 있다. 이 올리고뉴클레오티드는 원하는 돌연변이 부위 부근의 뉴클레오티드 서열을 포함한다; 올리고뉴클레오티드 합성 동안 돌연변이체 뉴클레오티드가 삽입된다. 특이적인 방법에서는 리파제- 암호화 서열을 연결하는 DNA의 단일-가닥 틈이 리파제 유전자를 돌연변이시키는 데에 사용된다.

그 다음 원하는 돌연변이를 함유하는 합성 뉴클레오티드가 단일-가닥 DNA의 상동 부분에 어닐링(annealing) 된다.

그 다음 남아 있는 틈은 DNA 중합효소 I (Klenow 단편) 으로 채워지고 T4 리가제를 사용하여 구조체가 결합된다.

이러한 방법의 특이적인 실례가 모리나가등 (Morinaga et al.) (1984, Biotechnology 2: 646-639)에 의해 기술되었다. 1988년 7월 26일 발행된 에스텔등 (Estell et al.)의 미국특허 4,760,025는 카세트의 약간의 변화를 수행함으로써 다수의 돌연변이를 암호화하는 올리고뉴클레오티드의 도입을 개시하였다.

그러나 다양한 길이의 다수의 올리고뉴클레오티드가 도입될 수 있기 때문에 모리나가 방법에 의하여 훨씬 더 다양한 돌연변이가 한번에 도입될 수 있다.

리파제- 암호화 서열속에 돌연변이를 도입하는 다른 방법이 Nelson 및 Long, Analytical Biochemistry 180, 1989, pp. 147-151에서 기술되었다.

그것은 PCR 반응에서 프라이머의 하나로서 화학적으로 합성된 DNA 가닥을 사용함으로써 도입된 원하는 돌연변이를 포함한 PCR 단편의 3-단계 생성을 포함한다.

PCR-생성 단편으로 부터, 돌연변이를 운반하는 DNA 단편이 제한효소로 절단함으로써 분리될 수 있고 발현 플라스미드 속에 재삽입될 수 있다. (이 방법이 추가로 개괄되어 있는 제 3 및 4도 참조).

리파제 변체의 발현

본발명에 따라, 상기에서 기술한 방법, 또는 당업계에서 공지된 어떤 다른 방법에 의해 제조된 돌연변이된 리파제- 코딩서열은 발현백터를 사용하여 효소형태로 발현될 수 있다. 발현백터는 전형적으로 프로모터, 오퍼레이터, 리보솜 결합부위, 트랜스라이선 개시 시그널을 암호화하는 조절서열, 및 선택적으로 억제 유전자 또는

다양한 활성유전자를 포함한다.

발현된 단백질을 분비시키기 위해 "시그널서열"을 암호화하는 뉴클레오티드가 리파제 - 코딩서열 전에 삽입될 수 있다.

조절서열 방향하의 발현을 위해, 본발명에 따라 처리될 표적 유전자가 적당한 리딩 프레임(reading frame)으로 조절서열에 작동적으로 연결된다.

플라스미드 벡터속에 투입될 수 있고 돌연변이체 리파제 유전자의 전사를 지지할 수 있는 프로모터 서열은 원핵생물의 β -락탐아제 프로모터(Villa-Kamaroff 등, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731) 및 tac 프로모터(DeBoer 등, 1983, Proc.

Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25)를 포함하지만 제한되지는 않는다.

또한 추가의 참고문헌은 Scientific American, 1980, 242:74-94의 "제조합 세균의 유용한 단백질"에서 발견될 것이다.

한 구체예에 따라 B.subtilis가 돌연변이된 DNA를 운반하는 발현벡터에 의하여 형질전환되었다. 발현이 B. subtilis 따위의 분비하는 미생물에서 일어난다면

시그널 서열은 트랜스레이션 개시 시그널 다음에 있을 수 있고 관심 있는 DNA 서열 앞쪽에 있을 수 있다. 시그널 서열은 발현 생성물을 세포벽으로 운반하는 작용을 하고 거기서 분비시 생성물로 부터 그것이 절단된다.

상기에서 정의된 대로 "조절서열" 용어는 시그널 서열이 존재할때 시그널 서열을 포함하도록 의도된다.

본발명의 리파제 변체를 제조하는 현재 바람직한 방법에서는, 필라멘트 곰팡이가 숙주생물체로서 이용된다. 필라멘트 곰팡이 숙주생물체는 편리하게도 제조합 단백질을 제조하기 위한 숙주로서 이전에 이용된 것일 수 있는데, 예컨대 A. niger,

A. nidulans 또는 A. oryzae 따위의 Aspergillus sp. 균주가 그것이다.

제조합 단백질 제조에 A. oryzae 를 이용한 것이 예컨대 EP 238 023에서 광범위하게 기술되었다.

Aspergillus 에서 리파제 변체의 발현을 위하여, 프로모터가 리파제 변체를 암호화하는 DNA 서열 앞쪽에 놓인다. 프로모터는 Aspergillus 에서 강한 전사활성을 나타내는 어떤 DNA 서열일 수 있고 아밀라제, 글루코아밀라제, 프로테아제, 리파제, 셀룰라제 또는 당분해효소 따위의 세포내 또는 세포외 단백질을 암호화하는 유전자로부터 추출될 수 있다.

적당한 프로모터의 실례는 A. oryzae TAKA 아밀라제, Rhizomucor miehei 아스파르트 단백질 가수분해효소, A. niger 중성 α -아밀라제, A. niger 산안정 α -아밀라제, A. niger 글루코아밀라제, Rhizomucor miehei 리파제, A. oryzae 알칼리 프로테아제 또는 A. oryzae 트리오스 포스페이트 이성화효소를 암호화하는 유전자로부터 추출된 것이다.

특히 숙주 생물체가 A. oryzae 일때 본발명의 공정에 사용하기 위한 바람직한 프로모터는 그것이 A. oryzae 에서 강한 전사활성을 나타내기 때문에 A. oryzae TAKA 아밀라제 프로모터이다. TAKA 아밀라제 프로모터의 서열은 EP 238 023에서 나타내진다.

중결 및 폴리아데닐화 서열은 적당히 프로모터와 같은 공급원에서 추출될 수 있다.

곰팡이 숙주세포를 형질전환하는데 이용된 기술은 적당히 EP 238 023에서 기술된 것과 같을 수 있다.

숙주세포로부터 리파제 변체의 분비를 위해 리파제 변체를 암호화하는 DNA 서열 앞쪽에 천연적으로 존재하는 시그널서열 또는 그것의 작용부 또는 세포로부터 단백질 분비를 제공하는 합성서열일 수 있는 시그널 서열이 놓일 수 있다.

특히 시그널 서열은 Aspergillus sp. 아밀라제 또는 글루코아밀라제를 암호화하는

유전자, Rhizomucor miehei 리파제 또는 프로테아제를 암호화하는 유전자, 또는 Humicola

셀룰라제, 크실란아제 또는 리파제를 암호화하는 유전자로부터 추출될 수 있다.

시그널 서열은 바람직하게는 A. oryzae TAKA 아밀라제, A. niger 중성 α -아밀라제,

A. niger 산-안정 α -아밀라제 또는 A. niger 글루코아밀라제를 암호화하는 유전자

로부터 추출된다.

형질전환된 숙주세포를 배양하는데 이용된 배지는 Aspergillus 세포를 생장시키는

때 적당한 어떤 통상적인 배지일 수 있다.

형질전환체는 대개 안정하며 선택압력 부재상태에서 배양될 수 있다.

그러나 형질전환체가 불안정하면, 선택을 위해 세포속으로 도입된 선택표지가 이용될 수 있다.

숙주세포로부터 분리된 성숙한 리파제 단백질은 잘 알려진 방법에 의하여 배양 배지에서 편리하게 회수될 수 있는데, 이 방법은 원심분리 또는 여과에 의해 배지에서 세포를 분리하고, 및 황산암모늄 따위의 염에 의해 배지의 단백질 성분을 침전시킨 후, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 크로마토그래피 방법을 포함한다.

본발명은 또한 바람직하게는 비-살포성 과립, 안정화된 액체 또는 보호된 효소의 형태로 본발명에 따른 리파제 변체를 포함하는 제정제 첨가물에 관련된다.

비- 살포성 과립은 예컨대 US 4,106,991 및 4,661,452 (양쪽 모두 Novo Industri A/S) 에 따라서 제조될 수 있고 선택적으로 당업계에서 공지된 방법에 의해 피복될 수 있다. 액체효소 제조물은 예컨대 확립된 방법에 따라 프로필렌글리콜 따위의 폴리알코올, 당 또는 당알코올, 락트산 또는 붕산을 첨가함으로써 안정화될 수 있다. 다른 효소 안정화제가 당업계에서 잘 공지되어 있다.

보호된 효소는 EP 238 216에서 게시된 방법에 따라 제조될 수 있다.

세정제 첨가물은 첨가물 그램당 효소단백질을 0.02-200mg 적당하게 포함할 수 있다. 세정제 첨가물은 추가로 통상적으로 세정제 첨가물 속에 포함되는 프로테아제, 셀룰라제, 피옥시다제 또는 아밀라제 따위의 하나 이상의 다른 효소들을 포함할 수 있다.

본발명의 또다른 면에서는 본발명의 리파제 변체를 포함하는 세정제 조성물에 관련된다. 본발명의 세정제 조성물은 부가적으로 계면활성제를 포함하는데, 이것은 음이온성, 비- 이온성, 양이온성, 양쪽성, 또는 양성이온 유형 뿐만아니라 이 계면활성제 유형의 혼합물 일수 있다.

적당한 계면활성제의 전형적인 실례는 선형알킬벤젠술포산(LAS), 알파올레핀술포산(AOS), 알코올에톡시설페이트(AEOS), 알코올에톡시레이트(AEO), 알킬설페이트(AS), 알킬 폴리글리코시드(APG) 및 천연지방산의 알칼리 금속염이다.

본발명의 세정제 조성물은 당업계에서 공지된 다른 세정제성분, 예컨대 연마제, 표백제, 표백활성화제, 항- 부식제, 봉쇄제, 얼룩- 제침착방지제, 향료, 효소안정화제 등을 포함할 수 있다.

본발명의 세정제 조성물은 어떤 편리한 형태 예컨대 분말 또는 액체로서 제조될 수 있다. 상기에서 지정한 것처럼 효소안정화제의 포함에 의해 효소가 액체 세정제에서 안정화될 수 있다.

대개 본발명의 세정제 조성물 용액의 pH는 7-12이고 어떤 경우에는 7.0-10.5일 것이다. 프로테아제, 셀룰라제, 펙시다제 또는 아밀라제 따위의 다른 세정제 효소가 본발명의 세정제 조성물속에 별도로 또는 상기에서 기술한 것과 같은 조합된 첨가물로 포함될 수 있다.

본발명은 하기의 실시예에서 더욱 기술되는데, 이 실시예는 청구된 본발명의 영역을 어떤 식으로든 제한하도록 의도되지 않는다.

일반적인 방법

Aspergillus oryzae에서 Humicola lanuginosa 리파제 및 Rhizomucor miehei 리파제의

발현

Humicola lanuginosa 리파제 및 Rhizomucor miehei 리파제의 클로닝은 각기 EP 305,

216 및 EP 238,023에서 기술되었다.

이 특허출원은 또한 Aspergillus oryzae에서의 두 리파제의 발현 및 특정화를 기술한다. 사용된 두 발현 플라스미드는 p960 (H. lanuginosa 리파제 유전자를 운반) 및 p787 (R. miehei 리파제 유전자를 운반) 이라고 명명되었다.

본 출원에서 사용된 발현 플라스미드는 리파제코딩 부위의 3'쪽에서의 약간의 변형을 제외하고는 p787 및 p960과 동일하다.

변형은 하기의 방법으로 행해졌다: p960을 NruI 및 BamHI 제한효소로 분해하였다.

이 두 부위 사이에 NheI 단편이 Klenow 중합효소로 채워진 플라스미드 pBR322로부터 BamHI/NheI 단편을 클로닝하여, 특이한 BamHI 및 NheI 부위를 포함하는 플라스미드 pA01 (제 5도) 을 생성하였다.

이 특이한 부위 사이에 p960 및 p787로부터 BamHI/XbaI 단편을 클로닝하여 각기

pAHL (제 6도) 및 pARML (제 7도) 을 생성하였다.

리파제 유전자의 부위- 방향성 생체의 돌연변이 유발

리파제 유전자 속에 돌연변이를 도입하는데 3가지 다른 방법을 이용했다.

한 방법은 Zoller & Smith, DNA, Vol. 3, No. 6, 479-488 (1984)에서 기술된 올리고뉴클레오타이드 부위- 방향성 돌연변이 유발이다.

이 방법은 하기에서는 간단히 기술되고 실시예 1에서 자세히 기술되었다.

발현 플라스미드로 부터 분리되어 관심 있는 리파제 유전자가 원형의 M13 박테리오파지 벡터속으로 삽입되었다.

단일- 가닥 계능에 화학적으로 합성된 상보적인 DNA-가닥이 어닐링되었다.

이 DNA-가닥은 원형의 DNA 상의 리파제 서열에 상보적인 서열부근에 도입된 돌연변이를 포함한다. 생체외에서 프라이머가 Klenov. 중합효소를 사용하여 생화학적으로 원형의 계능 전체 길이로 연장되었다.

E. coli 에서 형질전환되었을 때 헤테로 이중체가 원하는 서열을 갖는 이중- 가닥 DNA 로 될 것이며 이것으로 부터 단편이 분리되고 발현 플라스미드 속에 재- 삽입될 수 있다.

이용된 다른 방법은 Nelson & Long, Analytical Biochemistry, 180, 147-151 (1989)에서 기술되었다. 그것은 PCR-반응에서 프라이머중 하나로서 화학적으로 합성된 DNA-가닥을 이용함으로써 도입된 원하는 돌연변이를 포함하는 PCR (중합효소사슬반응) 단편의 3-단계 생성을 포함한다.

PCR-생성 단편으로 부터 돌연변이를 운반하는 DNA 단편은 제한효소로 절단함으로써 분리될 수 있고 발현 플라스미드 속에 재- 삽입될 수 있다.

이 방법은 실시예 3에서 완전하게 기술되었다. 제 3도 및 제 4도에서 이 방법이 추가로 개괄되었다.

대개 "카세트 돌연변이유발" 이라 불리는 추가의 방법에서는, 리파제- 암호화 부위의 두 제한부위 사이의 부분이 원하는 돌연변이를 운반하는 합성 DNA 단편에 의하여 대체되었다.

리파제 변체 I

실시예 1: Humicola lanuginosa 리파제의 D96L 변체를 발현하는 플라스미드의 구성

리파제 유전자의 분리:

발현플라스미드 p960은 BamHI/XbaI 제한 단편상에 Humicola lanuginosa 리파제의 코딩부위를 포함한다 (리파제의 DNA 및 아미노산 서열은 첨부된 서열리스트 ID No.1 에서 보여진다).

BamHI/XbaI 단편은 하기와 같이 분리되었다: 발현플라스미드를 제한효소 BamHI 및 XbaI과 배양하였다. 조건은 다음과 같다: 5 μ g 플라스미드, BamHI 10유니트, XbaI 10 유니트, 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM MgCl₂ 및 50 μ l 부피내 1mM DTT. 온도는 37 $^{\circ}$ C였고 반응시간은 2시간 였다.

두 단편은 1% 아가로스 겔상에서 분리되었고, 원하는 단편을 겔에서 분리하였다.

벡터 M13mp18 과의 결합:

이중- 가닥의 복제형태의 박테리오파지 벡터 M13mp18 이 상기에서 기술된 조건하에서 BamHI 및 XbaI으로 분해되었다. 분리된 제한 단편을 하기의 반응 혼합물에서

분해된 박테리오파지 벡터에 결합시켰다: 단편 0.2 μ g, 벡터 0.02 μ g, 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 10mM MgCl₂, 10mM DTT 및 1mM ATP, 부피 20 μ l, 16 $^{\circ}$ C, 3시간.

이 혼합물 5 μ l 를 E. coli 균주 JH101 속에 형질전환시켰다.

벡터내의 단편의 존재는 형질전환체로 부터 분리된 이중- 가닥 M13-DNA 상의 제한 효소 분석에 의해 확인되었다.

단일- 가닥(SS) DNA (주형) 의 분리:

상기에서 기술한 형질전환체로 부터 SS DNA를 메싱(Messing) 이 Gene. 19, 269-276 (1982)에서 기술한 방법에 따라 분리하였다.

돌연변이유발 프라이머의 5'인산화:

서열 5'-TTTCITTTCAACAAGAAGTTAAGA-3' 을 갖는 돌연변이 유발프라이머는 70mM Tris-HCl, pH 7.0, 10mM MgCl₂, 5mM DTT, 1mM ATP, 100pmol 올리고뉴클레오티드 및 3.6 유니트의 T4 폴리뉴클레오티드 키나제를 포함하는 30 μ l 반응혼합물에서 5' 말단에서 인산화되었다. 반응은 37°C에서 30분 동안 수행되었다.

그 다음 65°C에서 10분간 혼합물을 배양함으로써 효소가 불활성화되었다.

주형 및 인산화된 돌연변이유발 프라이머의 어닐링:

주형과 프라이머의 어닐링은 0.5pmol 주형, 5pmol 프라이머, 20mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM MgCl₂, 50mM NaCl 및 1mM DTT를 포함하는 10 μ l 부피에서 65°C에서 10분간 가열하고 그후 0°C로 냉각시킴으로써 수행되었다.

연장/ 결합반응:

상기의 반응혼합물에 하기의 혼합물 10 μ l 를 첨가하였다:

0.3mM dATP, 0.3mM dCTP, 0.3mM dGTP, 0.3mM TTP, 1mM ATP, 20mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 3유니트의 T4 DNA 리가제 및 2.5 유니트의 Klenow 중합효소.

그 다음 16°C에서 16시간 동안 반응을 수행하였다.

JM101 의 형질전환:

상기 반응혼합물을 표준기술을 이용하여 CaCl₂- 처리된 E. coli JM101 세포속에 다른 희석물로 형질전환시키고 2 \times YT 한천 플레이트상의 2 \times YT 톱(top) 한천에 평판배양시켰다.

(2 \times YT = 트립톤 16g/l, 효모추출물 10g/l, NaCl 5g/l. 2 \times YT 톱한천 = 2 \times YT

에 0.4% 아가로스를 첨가하고 가압멸균함. 2 × YT 한천 플레이트 = 2 × YT 에 2% 한천을 첨가하고 가압멸균함). 플레이트를 하룻밤 동안 37℃에서 배양 하였다.

포지티브 클론의 확인:

사용된 방법은 하기에 기술되는 플라크- 리프트 혼성화(Plaque-lift hybridization) 였다: 적당한 플라크- 밀도를 갖는 플레이트에 니트로셀룰로스 필터를 놓고 필터가 젖게 한다. 그 다음 필터를 하기의 용액속에 담갔다: 1.5M NaCl, 0.5M NaOH 에 30초, 1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl, pH 8.0에 1분 그리고 이후에 사용할 때까지 2 × SSC (0.3M NaCl, 0.03M 시트르산나트륨). 필터를 3MM 필터종이상에서 건조시키고 진공오븐에서 80℃에서 2시간 동안 구웠다.

서열 5'-TTTCTTTCAACAAGAAGTTAAGA-3' 을 갖는 돌연변이 유발프라이머를 70mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM MgCl₂, 5mM DTT, 10pmol 올리고뉴클레오타이드, 20pmol γ-32p-ATP 및 3.5 유니트의 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제를 포함하는 30μl 부피에서 5'- 말단에 방사성 표지시켰다. 혼합물을 30분간 37℃에서 배양하였다.

그 다음 100℃에서 5분간 배양하였다.

건조시킨 필터를 65℃에서 2시간 동안 6 × SSC, 0.2% 소혈청알부민, 0.2% 피콜 (Ficoll), 0.2% 폴리비닐피롤리돈, 0.2% 황산도데실나트륨(SDS) 및 50μg/ml 초음파 처리한 언어정자 DNA 에서 전(前) 혼성화시켰다.

그 다음 표지된 프로브를 포함하는 반응혼합물을 새로운 전- 혼성화 혼합물 15ml에 첨가하고, 약하게 교반하면서 27℃에서 하룻밤 동안 필터를 여기에 담가 놓았다.

혼성화 후에 필터를 2 × SSC, 0.1% SDS 에서 각 15분씩 3번 세척하였고 방사성사진화 하였다. 똑같은 용액에서 세척, 그러나 이제는 50℃에서 세척한 후 다시

방사성사진화한 후, 돌연변이유발 프라이머에 상보적인 DNA-서열을 포함하는 플라크가

확인되었다.

확인된 클론은 헤테로 이중체의 결과이기 때문에 플라크를 다시 평판배양 하였다.
혼성화 및 확인 단계를 반복하였다.

이중-가닥 M13-파지 DNA 의 정제:

제-스크리닝된 클론을 E. coli 균주 JM101 의 감염에 사용하였다.

대략 10^8 파지 및 5 콜로니의 JM101 을 포함하는 배양물을 37°C 에서 5ml 의 $2 \times \text{YT}$ 배지에서 5 시간 동안 성장시켰다.

그 다음 이중가닥의 원형 DNA 를 펠렛으로 부터 Birnboim & Doly, Nucleic Acids Res., 2, 1513 (1979)에 기술된 방법에 따라 정제하였다.

변형된 리파제를 암호화하는 제한 단편의 분리:

상기에서 분리된 DNA 제조물 (대략 $5\mu\text{g}$)을 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM MgCl_2 및 10mM DTT $60\mu\text{l}$ 에서 2시간 동안 37°C 에서 제한효소 BamHI 및 XbaI 각각 10유니트로 분해시켰다.

DNA 생성물은 아가로스겔상에서 분리하고 겔로 부터 단편을 정제하였다.

Aspergillus 발현 벡터 pA01 (제 5도) 과의 결합:

분리한 제한 단편을 하기의 반응혼합물에서 제한효소 BamHI 및 NheI으로 분해된

Aspergillus 벡터 pA01에 결합시켰다: $20\mu\text{l}$ 의 전체부피내 단편 $0.2\mu\text{g}$, 벡터 $0.02\mu\text{g}$, 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 10mM MgCl_2 , 10mM DTT, 1mM ATP.

이 반응혼합물 $5\mu\text{l}$ 를 E. coli 균주 MC1061의 형질전환에 이용하였는데, 여기서 변형된 발현 플라스미드가 확인되고 증식되었다.

이 플라스미드는 pAHL96L이라 명명되었고 변형된 코돈(codon) 을 제외하고는 pAHL과 동일하다.

pAHL96L의 서열증명:

돌연변이된 플라스미드를 이중-가닥 플라스미드상에서 직접 생거(Sanger)에 의해 본래 기술된 디데옥시 사슬종결 방법을 사용하여 서열결정하였다.

실시예 2: Humicola 리파제의 다른 변체를 발현하는 플라스미드의 구성

실시예 1에서 기술한 것과 똑같은 방법을 이용하여 다른 돌연변이체 리파제 유전자가 구성되었다. 플라스미드 이름 및 변형에 사용된 프라이머는 하기에 열거되어 있다.

플라스미드명	프라이머서열
PAHLD96N	5'-TCTTTCAAGTTGAAGTTAAGA-3'
PAHLD111N	5'-GTGAAGCCGTTATGTCCCCTG-3'
PAHLE87Q	5'-CGATCCAGTTTTGTATGGAACGA-3'
PAHLR209A/E210A	5'-GCTGTAACCGAAAGCAGCCGGCGGGAGTCT-3'
PAHLE87A	5'-CGATCCAGTTAGCTATGGAACG-3'
PAHLE56A	5'-CTCCAGAGTCAGCAAACGAGTA-3'
PAHLE56Q	5'-CCAGAGTCTTGAAACGAGTAG-3'
PAHLD111L	5'-AAGTGAAGCCCCAAATGTCCCCTG-3'
PAHLE210A	5'-TGTAACCGAAAGCGCGGGCGG-3'
PAHLE210Q	5'-TAACCGAATTGGCGGGCGGG-3'
PAHLR209A	5'-AACCGAATTCAGCCGGCGGGAGT-3'

실시예 3: Humicola lanuginosa 리파제의 D254N 변체를 발현하는 플라스미드의 구성

플라스미드 pAHL의 선상화:

원형의 플라스미드 pAHL을 하기의 50 μ l 반응혼합물에서 제한효소 SphI으로 선상화시켰다: 50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7.9, 10mM MgCl₂, 1mM 디티오프레이톨, 1 μ g 플라스미드 및 2유니트의 SphI. 분해는 37°C에서 2시간 수행되었다. 반응혼합물을 패놀(Tris-HCl, pH 7.5 로 평형된) 로 추출하고 얼음-냉각된 96% 에탄올을 2배 부피만큼 첨가하여 침전시켰다.

원심분리 및 펠렛의 건조 후, 선상화된 DNA 를 50 μ l H₂O 에 녹였고 아가로스젤상

에서 그 농도를 측정하였다.

3-단계 PCR 돌연변이유발:

제 4도에서 보여지듯이, 3-단계 돌연변이유발은 네개의 프라이머의 사용을 포함한다:

돌연변이 유발 프라이머 (=A):

5'-GTGCGCAGGGATGTTTCGGAATGTTAGG-3'

PCR 헬퍼 1 (=B):

5'-GGTCATCCAGTCACTGAGACCCTCTACCTATTAAATCGGC-3'

PCR 헬퍼 2 (=C): 5'-CCATGGCTTTTCACGGTGTCT-3'

PCR 헬퍼 (=D): 5'-GGTCATCCAGTCACTGAGAC-3'

세단계 모두 하기의 것이 포함된 완충용액에서 수행되었다:

10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% 젤라틴, 0.2mM dATP, 0.2mM dCTP, 0.2mM dGTP, 0.2mM TTP, 2.5 유니트의 Taq 중합효소.

단계 1에서는, 전체 100 μ l 반응혼합물에 100pmol 프라이머 A, 100pmol 프라이머 B 및 1fmol 선상화된 플라스미드를 첨가하였다.

그리고 95°C에서 2분, 37°C에서 2분 및 72°C에서 3분으로 구성되는 15사이클을 수행하였다.

PCR 생성물의 농도를 아가로스겔상에서 측정하였다. 그 다음 단계 2가 수행되었다. 이전에 언급한 완충용액 100 μ l 속에 0.6pmol 단계 1 생성물 및 1fmol 선상화된 플라스미드가 포함되었고, 95°C에서 5분, 37°C에서 2분 및 72°C에서 10분으로 구성되는 1 사이클이 수행되었다.

단계 2 반응혼합물에 100pmol 프라이머 C 및 100pmol 프라이머 D가 첨가되었고 (각각 1 μ l) 95°C에서 2분, 37°C에서 2분 및 72°C에서 3분으로 구성되는 20 사이클이 수행되었다. 이 조작은 돌연변이 유발과정에서 단계 3을 구성했다.

돌연변이된 제한 단편의 분리:

단계 3의 생성물을 아가로스겔에서 분리하여 20 μ l H₂O 에 다시 녹였다.

그 다음 하기의 조성물을 갖는 전체부피 50 μ l 내의 제한효소 BspMII로 분해시켰다:

100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 7.9, 10mM MgCl₂, 1mM DTT 및 10 유닛의 BspMII.

2 시간 동안 37°C에서 배양하였다.

아가로스겔에서 264bp BspM III 단편을 분리하였다.

발현 벡터 pAHL과의 결합:

발현플라스미드 pAHL를 상기에서 나타난 조건하에서 BspMII로 절단하였고 아가로스 겔로 부터 큰 단편을 분리하였다.

이 벡터에 상기에서 분리된 돌연변이된 단편을 결합시키고, E. coli 를 형질전환하는 데 결합혼합물을 사용하였다. 단편의 존재 및 방향은 형질전환체의 플라스미드

드 제조물을 제한효소로 절단함으로써 확인되었다.

서열분석은 생거에 의해 개발된 디- 데옥시 사슬종결방법을 이용하여 이중- 가닥 플라스미드 상에서 수행되었다. 플라스미드를 pAHL254N 이라고 명명하였고

이것은 변경된 코돈을 제외하고는 pAHL과 동일하다.

실시예 4: Humicola 리파제의 다른 변체를 발현하는 플라스미드의 구성

하기의 돌연변이체는 돌연변이된 단편의 재클로닝에 사용된 벡터 및 PCR-생성물을 분해하는데 다른 제한효소가 이용된 것을 제외하고는 실시예 3에서 기술된 것과 똑같은 방법을 이용하여 구성되었다.

변경에 사용된 플라스미드 이름과 프라이머는 하기에 열거된다.

플라스미드명	프라이머 A 서열
pAHL254K	5'-GTGCGCAGGGATCTTCGGAATGTT-3'
pAHL254R	5'-GTGCGCAGGGATTCTCGGAATGTT-3'
pAHL242N	5'-GCCGCCGGTGGCGTTGATGCCTTCTAT-3'
pAHL242N/D254N	5'GTGCGCAGGGATGTTTCGGAATGTTAGGCTGGTTATTGC CGCCGGTGGCGTTGATGCCTTCTAT-3'

PAHLE87R 5'-CCCGATCCAGTTTCTTATCGATCGAGAGCCGCGG-3'
 PAHLE87K 5'-CGATCCAGTTCTTTATCGATCGAGAGCCACGG-3'

실시예 5: 이용가능 돌연변이체의 조합에 의한 리파제 변체의 구성

하기의 돌연변이체는 상기에서 구성된 돌연변이체의 플라스미드 단편들을 결합함으로써 구성되었다. 예컨대 pAHLE87K/D254K는 pAHLE87K로부터 BamHI/BstXI 제한 단편을 분리하고 BamHI 및 BstXI 으로 분해된 pAHL254K 속에 이 단편을 삽입함으로써 구성되었다.

플라스미드

pAHLE87K/D254K
 pAHLE87Q/D254N/D242N/E210Q
 pAHLE87Q/D242N/E210Q
 pAHLR209A/E210A/D96L
 pAHLR209A/E210Q/E56Q
 pAHLE210Q/D242N/D254N
 pAHLE87Q/E210Q/D242N

리파제 변체 II

실시예 6: Humicola lanuginosa 리파제의 Δ L264->L269 변체를 발현하는 플라스미드의

구성

플라스미드 pAHL의 선상화:

원형의 플라스미드 pAHL은 하기의 50 μ l 반응혼합물에서 제한효소 SphI으로 선상화되었다: 50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7.9, 10mM MgCl₂, 1mM 디티오프레이톨, 1 μ g 플라스미드 및 2유니트의 SphI. 분해반응은 37°C에서 2시간 동안 수행되었다. 반응혼합물을 페놀(Tris-HCl, pH 7.5 로 평형된) 로 추출하고 2부피 만큼의 얼음-냉각된 96% 에탄올을 첨가하여 침전시켰다.

원심분리 및 펠렛의 건조후에 선상화된 DNA 를 50 μ l H₂O 에 녹이고 아가로스겔상

에서 농도를 측정하였다.

3-단계 PCR 돌연변이유발:

제 4도에서 보여지는 것처럼, 3-단계 돌연변이 유발은 네개의 프라이머의 이용을 포함한다:

돌연변이 유발 프라이머 (=A):

5'-CAGGCGCGCCGCGCCACCCGAAGTACCATAG-3'

PCR 헬퍼 1 (=B):

5'-GGTCATCCAGTCACTGAGACCCTCTACCTATTAAATCGGC-3'

PCR 헬퍼 2 (=C): 5'-CCATGGCTFTTCACGGTGTCT-3'

PCR 헬퍼 (=D): 5'-GGTCATCCAGTCACTGAGAC-3'

헬퍼 1 및 헬퍼 2는 코딩부위의 외부서열에 상보적이다.

3단계 모두 하기의 완충용액에서 수행되었다: 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM

KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% 젤라틴, 0.2mM dATP, 0.2mM dCTP, 0.2mM dGTP, 0.2mM TTP,

2.5 유닛 Taq 중합효소.

단계 1에서는 100pmol 프라이머 A, 100pmol 프라이머 B 및 1fmol 선상화된 플라스미드를 전체 100 μ l 반응혼합물에 첨가하였고 95°C에서 2분, 37°C에서 2분 및 72°C에서 3분으로 구성되는 15사이클이 수행되었다.

PCR 생성물의 농도는 아가로스겔상에서 측정되었다. 그 다음 단계 2가 수행되었다. 0.6pmol 단계 1생성물 및 1fmol 선상화된 플라스미드가 이전에 언급한 완충용액 전체 100 μ l 내에 포함되었고 95°C에서 5분, 37°C에서 2분 및 72°C에서 10분으로 구성되는 1 사이클이 수행되었다.

단계 2 반응혼합물에 100pmol 프라이머 C 및 100pmol 프라이머 D가 첨가되었고 (각각 1 μ l) 95°C에서 2분, 37°C에서 2분 및 72°C에서 3분으로 구성되는 20사이클이 수행되었다. 이 조작은 돌연변이 유발과정에서 단계 3을 구성했다.

돌연변이된 제한 단편의 분리:

단계 3의 생성물은 아가로스겔로 부터 분리되었고 20 μ l H₂O 에 다시 녹였다.

그 다음 그것은 하기의 조성을 갖는 전체 부피 50 μ l 에서 제한효소 Bgl II 및 BstXI 으로 분해되었다: 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 7.9, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 10 유닛의 Bgl II 및 10 유닛의 BstXI. 배양은 37°C에서 2시간 동안 수행되었다. 200bp Bgl II/BstXI 단편이 아가로스겔에서 분리되었다.

발현 벡터 pAHL과의 결합:

발현 플라스미드 pAHL을 상기에 나타난 조건하에서 Bgl II 및 BstXI으로 절단시켰고 아가로스겔에서 큰 단편을 분리하였다.

이 벡터에 상기에서 분리된 돌연변이된 단편을 결합시키고 E. coli 를 형질전환시키는 데 결합혼합물을 사용하였다.

단편의 존재는 형질전환체의 플라스미드 제조물을 제한효소로 절단함으로써 확인되었다. 서열분석은 생거에 의해 개발된 디- 데옥시 사슬종결방법을 이용하여 이중- 가닥 플라스미드상에서 수행되었다. 플라스미드는 pAHL Δ L264->L269라고 명명되었고 삭제된 코돈을 제외하고는 pAHL과 동일하다.

실시예 7: Humicola 리파제의 다른 변체를 발현하는 플라스미드의 구성

하기의 돌연변이체는 돌연변이된 단편의 재클로닝에 사용된 벡터 및 PCR-생성물을 분해시키는데 다른 제한효소가 이용된 것을 제외하면 실시예 6에서 기술된 것과 똑같은 방법을 이용하여 구성되었다.

변형에 이용된 플라스미드 이름 및 프라이머는 하기에 나열되어 있다.

플라스미드명

pAHL Δ N247->D254

pAHL Δ E239* + I241* + D242*

프라이머 A 서열

5' -TAGGTGCGCAGGGATCGGAATGTTAG
GCTGGTTGCCGCCGGTGGCATC-3'

5' -ATTGCCGCCGGTGGCGCCTATCTTCA
CGATATC-3'

실시예 8: 카세트 돌연변이 유발에 의한 리파제 변체 L206V의 구성

실시예 6에서 개관한 방법을 이용하여 플라스미드 pAHL상의 코딩서열이 특이한 Avr II 및 Mlu I 부위를 포함하도록 변형되었다.

Avr II 부위는 코딩서열의 G681을 아데노신으로 변화시켜서 만들어졌다.

MluI 부위는 C759를 G로 그리고 A762를 T로 변화시켜서 만들어졌다.

새로운 플라스미드는 pAHL7이라고 명명되었고 pAHL과 똑같은 리파제를 암호화한다.

Avr II- 및 MluI- 부위 사이에 하기의 합성적으로 제조된 링커가 삽입되었다 (형질 전환체 중에서 용이하게 스크리닝하기 위해 Leu-코돈을 Val-코돈으로 변화시키고 ScaI- 부위를 삭제하였다):

```
AvrII  CTAGGGTTCGCGCGCGGAATTCGGTTACAGCCATTCT
      CCAAGGCGGCGCGCTTAAGCCAATGTCGGTAAGA
      ArgValProProArgGluPheGlyTyrSerHisSer -
      205              210              216
```

*

```
AGCCCAGAATACTGGATCAAATCTGGAACCCCTTGTCCTCCCGTCA   MluI
TCGGGTCTTATGACCTAGTTTAGACCTTGGGAACAGGGGCAGTGCGC
SerProGluTyrTrpIleLysSerGlyThrLeuValProValThrArg
217      220              225              230
```

결과적인 플라스미드는 pAHL7L206V 이라고 명명되었고, 변화된 염기를 제외하고는 pAHL과 동일하다.

실시예 9: 카세트 돌연변이 유발을 이용한 다른 리파제 변체의 구성

실시예 8에서 기술된 카세트 돌연변이 유발에 의해 구성된 다른 돌연변이체는 하기에 나열되어 있다. 적당한 돌연변이를 도입하기 위해 다른 링커가 이용되었다.

플라스미드 명
pAHL206A
pAHLF211V
pAHLF211A
pAHLDR209/E210

리파제 변체 III

실시예 10: Humicola lanuginosa 리파제의 D62C + E87C 변체를 발현하는 플라스미드의

구성

플라스미드 pAHL의 선상화:

원형의 플라스미드 pAHL을 하기의 50 μ l 반응혼합물에서 제한효소 SphI으로 선상화
시켰다: 50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7.9, 10mM MgCl₂, 1mM 디티오프레이톨, 1 μ g
플라스미드 및 2유니트의 SphI. 분해는 37°C에서 2시간 동안 수행되었다.

반응혼합물을 페놀(Tris-HCl, pH 7.5 로 평형된) 로 추출하고 2부피만큼의 얼음- 냉각된
96% 에탄올을 첨가하여 침전시켰다.

원심분리 및 펠렛의 건조후에 선상화된 DNA 를 50 μ l H₂O 에 녹이고 아가로스겔상
에서 농도를 측정하였다.

3-단계 PCR 돌연변이유발:

제 4도에서 보여진 것처럼, 3-단계 돌연변이유발은 네개의 프라이머의 이용을 포함한다:
돌연변이 유발 프라이머

(=A): 5'-ATTCCCGATCCAGTTACATATGGAACGAGAGCCACGGAAGCTTAGGACG
ATCAATTTGTTCTGTGTCGAGAGCAAGGAAGCCGGTGACACAGCCCACTC
CAGAGTC-3'

PCR 헬퍼 1 (=B): 5'-GGTCATCCAGTCACTGAGACCCTCTACCTATTAAA-
TCGGC-3'

PCR 헬퍼 2 (=C): 5'-CCATGGCTTTTCACGGTGTCT-3'

PCR 핸들 (=D): 5'-GGTCATCCAGTCACTGAGAC-3'

리파제 코딩부위에서 두 코돈을 변화시킨 것은 별도로 하고 프라이머 A는 또한 휴지상태의 돌연변이(Silent mutation)를 도입하여 코돈-변화 사이에 하나의 HindIII-부위를 만들어낸다.

3단계 모두 하기의 완충용액에서 수행되었다: 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% 젤라틴, 0.2mM dATP, 0.2mM dCTP, 0.2mM dGTP, 0.2mM TTP, 2.5 유닛의 Taq 중합효소.

단계 1에서는, 전체 100 μ l 반응혼합물에 100pmol 프라이머 A, 100pmol 프라이머 B 및 1fmol 선상화된 플라스미드를 첨가하였고, 95°C에서 2분, 37°C에서 2분 및 72°C에서 3분으로 구성되는 15 사이클을 수행하였다.

PCR 생성물의 농도를 아가로스겔상에서 측정하였다. 그 다음 단계 2가 수행되었다. 이전에 언급한 완충용액 100 μ l 에 0.6pmol 단계 1 생성물 및 1fmol 선상화된 플라스미드가 포함되었고 95°C에서 5분, 37°C에서 2분 및 72°C에서 10분으로 구성되는 1 사이클이 수행되었다.

단계 2 반응혼합물에 100pmol 프라이머 C 및 100pmol 프라이머 D가 첨가되었고 (각각 1 μ l) 95°C에서 2분, 37°C에서 2분 및 72°C에서 3분으로 구성되는 20사이클이 수행되었다. 이 조작은 돌연변이 유발과정에서 단계 3을 구성하였다.

돌연변이된 제한 단편의 분리:

아가로스겔에서 단계 3의 생성물을 분리하여 20 μ l H₂O 에 다시 녹였다.

그 다음 그것을 하기의 조성을 갖는 전체부피 50 μ l 에서 제한효소 BamHI 및 BstXI

으로 분해시켰다: 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 7.9, 10mM MgCl₂, 1mM DTT,

10유닛의 BamHI 및 10유닛의 BstXI. 반응은 2시간 동안 37°C에서 수행되었다.

아가로스겔에서 733bp BamHI/BstXI 단편을 분리하였다.

발현벡터 pAHL과의 결합:

발현 플라스미드 pAHL을 상기에 나타난 조건하에서 BamHI 및 BstXI으로 절단하고 아가로스겔에서 큰 단편을 분리하였다.

이 벡터에 상기에서 분리된 돌연변이된 단편을 결합시키고 E. coli 를 형질전환하는데 결합 혼합물을 사용하였다. 단편의 존재 및 방향은 형질전환체의 플라스미드 제조물을 제한효소로 절단하여 확인되었다.

서열분석은 생거에 의해 개발된 디데옥시 사슬종결 방법을 사용하여 이중-가닥 플라스미드상에서 수행되었다. 플라스미드는 pAHLΔ62C/E87C 라고 명명되었고 변경된 코돈을 제외하고는 pAHL과 동일하다.

실시예 11: Humicola 리파제의 다른 변체를 발현하는 플라스미드의 구성

하기의 돌연변이체는 돌연변이된, 단편의 재클로닝에 이용된 벡터 및 PCR-생성물을 분해하는데 다른 제한효소가 사용된 것을 제외하면 실시예 10 에서 기술된 것과 똑같은 방법을 이용하여 구성되었다.

변경에 이용된 플라스미드 이름 및 프라이머가 하기에 나열되어 있다.

플라스미드명	프라이머 A 서열
PAHLG61C/E87C	5'-AAGATTCCCCGATCCAACACTCTATGGAACGAGAGCCACGGAAG-CCTTAGGACGATCAATTTGTTCTGTGTTGTCGAGAGCAAGGAAGCCGG-TGACATCACACACTCCAGAGTCTTC-3'
PAHLI255T/L259T	5'-TAACCCGAAGTACCAAGTGTGCGCAGGAGTATCCGGAATGTTAG-3'

실시예 12: 카세트 돌연변이유발에 의한 리파제 변체 L206V 의 구성

실시예 3에서 개발된 방법을 이용하여 플라스미드 pAHL상의 코딩서열이 특이한 Avr II 및 HluI 부위를 포함하도록 변경되었다.

Avr II 부위는 코딩서열의 G681을 아데노신으로 변화시킴으로써 만들어졌다.

HluI 부위는 C759를 G 로 및 A762를 T 로 변화시켜서 만들어졌다.

새로운 플라스미드는 pAHL7 이라고 명명되었고 pAHL과 똑같은 리파제를 암호화한다.

Avr II- 및 HluI- 부위 사이에 하기의 합성적으로 제조된 링커가 삽입되었다 (클로닝 된 링커로 클론중에서 쉽게 스크리닝하기 위하여 Leu-코돈을 Val-코돈으로 변화시키고 ScaI- 부위를 삭제함):

```
CTAGGGTTCGCGCGCGAATTCGGTTACAGCCATTCT
CCAAGGCGGCGCGCTTAAGCCAATGTCGGTAAGA
ArgValProProArgGluPheGlyTyrSerHisSer -
205                210                216
```

*

```
AGCCCAGAATACTGGATCAAATCTGGAACCCCTTGTCCTCCCGTCA
TCGGGTCTTATGACCTAGTTTAGACCTTGGAACAGGGGCAGTGCGC
SerProGluTyrTrpIleLysSerGlyThrLeuValProValThrArg
217        220        \        225        230
```

결과적인 플라스미드는 pAHL206V 라고 명명되었고, 변화된 염기를 제외하고는 pAHL과 동일하다.

실시예 13: 카세트 돌연변이 유발을 이용한 다른 리파제 변체의 구성

실시예 3에서 기술된 카세트 돌연변이유발에 의해 구성된 다른 돌연변이체가 하기에 나열되어 있다. 다른 링커가 적당한 돌연변이를 도입하기 위해 사용되었다.

pAHL206T
pAHL206S
pAHL206A
pAHL206G
pAHLF211L
pAHLF211T
pAHLF211K

실시예 14: 이용가능 돌연변이체의 조합에 의한 리파제 변체의 구성

하기의 돌연변이체는 상기에서 구성된 돌연변이체의 플라스미드 단편들을 조합함으로써 구성되었다.

예컨대 pAHLG61C + E87C 는 pAHL62C + E87C (두 돌연변이 사이에 하나의 HindIII 부위를 도입한 구성에 사용된 프라이머)에서 HindIII 제한 단편을 분리하고 이 단편을 HindIII (또한 돌연변이와 함께 도입된) 로 분해된 pAHLG61C + N88C 속에 삽입함으로써 구성되었다:

플라스미드

pAHL61C + E87C

pAHL206S + I255T + L259T

실시예 15

Aspergillus oryzae의 형질전환 (일반적인 방법)

100ml 의 YPD (Sherman 등, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981) 를 A. oryzae 의 포자로 접종하였고 약 24시간 동안 교반하면서 배양하였다.

미라클로쓰(miracloth) 를 통해 여과하여 균사체를 모으고 0.6M $MgSO_4$ 200ml로 세척하였다. 균사체를 1.2M $MgSO_4$, 10mM NaH_2PO_4 , pH = 5.8 15ml 속에 현탁시켰다. 현탁액을 얼음에서 냉각시켰고 Novozym® 234, 배치(batch) 1687을 120mg 포함하는 완충용액 1ml 을 첨가하였다.

5분 후에 1ml 의 12mg/ml BSA (시그마 타입 H25)를 첨가하고, 많은 수의 프로토 플라스트가 현미경 하에서 조사된 샘플에서 육안으로 보일때까지 37°C에서 1.5-2.5 시간 동안 약하게 교반하면서 배양하였다.

현탁액을 미라클로쓰를 통해 여과하였고, 여과물을 멸균 시험관으로 옮기고 0.6M 소르비톨, 100mM Tris-HCl, pH 7.0 을 5ml 만큼 위에 넣었다.

원심분리는 1000g 에서 15분 수행되었고 MgSO_4 쿠션의 위로 부터 프로토플라스트를 수집하였다. 프로토플라스트 현탁액에 2부피 만큼의 STC (1.2M 소르비톨, 10mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM CaCl_2) 를 첨가하고 이 혼합물을 1000g 에서 5분간 원심 분리하였다. 프로토플라스트 펠렛을 3ml 의 STC 에 재현탁시키고 재펠렛화 시켰다. 이것이 반복되었다. 최종적으로 프로토플라스트를 0.2-1ml 의 STC 에 재현탁시켰다.

100 μ l 의 프로토플라스트 현탁액을 STC 10 μ l 내의 5-25 μ g 의 p3SR2 (Hynes 등, Mol. and Cel. Biol., Vol. 3, No. 8, 1430-1439, Aug-1983 에서 기술된 플라스미드를 운반하는 A. nidulans amds 유전자) 와 혼합하였다.

혼합물을 실온에서 25분 동안 방치하였다. 0.2ml의 60% PEG 4000 (BDH 29576), 10mM CaCl_2 및 10mM Tris-HCl, pH = 7.5를 첨가하고 주의깊게 혼합하고 (두번) 최종적으로 0.85ml의 똑같은 용액을 첨가하고 주의깊게 혼합하였다.

혼합물을 실온에서 25분간 방치하고 2,500g에서 15분간 원심분리하고 펠렛을 1.2M 소르비톨 2ml 속에 재현탁시켰다.

한번 더 침강시킨 후에, 1.0M 수크로스, pH 7.0, 질소원으로서 10mM 아세트아미드 및 백그라운드 성장을 억제하기 위해 20mM CsCl를 포함하는 최소 배지 플레이트에 프로토플라스트를 퍼뜨렸다 (Cove, Biochem. Biophys. Acta 113 (1966) 51-56).

37°C에서 4-7 일간 배양한 후에 포자를 찍어서 멸균수에 현탁시키고 단일 콜로니로 퍼뜨렸다. 이 과정이 반복되었다. 두번째 재분리 후에 단일 콜로니 포자를 정의된 형질전환체로서 보관하였다.

실시예 16

A. oryzae 에서 리파제 변체 D96L의 발현

pAHL96L은 실시예 15에서 기술된 것처럼 *A. nidulans* 의 *amdS* 유전자를 포함하는 p3SR2 로 공형질전환 함으로써 *A. oryzae* IFO 4177 속으로 형질전환되었다.

기술된 대로 제조된 프로토플라스트가 pAHL96L 및 p3SR2 동량의 혼합물과 함께 배양되었는데, 각각 대략 5 μ g 이 사용되었다.

유일한 질소원으로서 아세트아미드를 사용할 수 있는 9 형질전환체가 두번 재분리되었다. 3일간 YPD 상에서 생장시킨 후 배양상층액을 실시예 16 (본발명의 리파제 변체의 정제)에서 기술된 리파제 활성검사를 이용하여 분석하였다.

더 연구하기 위해 가장 좋은 형질전환체를 선택하여 30℃에서 4일 동안 200ml 의 FG4 배지 (3% 소이밀 (soy meal), 3% 말토덱스트린, 1% 펩톤, 4M NaOH 로 pH를 7.0 으로 조정) 에서 11세이크-플라스크에서 생장시켰다.

이러한 조건하에서 형질전환체는 배양물 1ml 당 약 500리파제 단위를 나타냈다.

실시예 15에서 기술된 일반적인 방법을 이용하여, 다른 리파제 변체가 본질적으로 상기에서 기술한 대로 제조되었다.

실시예 17

본발명의 리파제 변체의 정제

리파제 활성검사:

리파제의 기질은 유화제로서 아라비아 고무를 이용하여 글리세린 트리부티레이트 (MERCK) 를 에멀션화시켜서 제조되었다.

리파제 활성은 pH 7에서 pH 안정방법을 이용하여 측정되었다. 리파제 활성의 일단위 (LU/mg) 는 1 분당 1 마이크로몰 지방산을 방출시키는데 필요한 양으로서 정의되었다.

단계 1: - 발효상층액을 원심분리하고, 침전물을 버린다. 상층액의 pH를 7로

조정하고 냉각된 96% 에탄올을 등부피만큼 점차적으로 첨가한다.

혼합물을 얼음수조에서 30분 동안 방치하고 원심분리하고 침전물을 버린다.

단계 2: - 이온교환 크로마토그래피. 상층액을 여과하고 50mM Tris- 아세트산

완충용액(pH 7)으로 평형된 DEAE- 패스트플로우(Pharmacia TM) 컬럼상에 적용한다.

컬럼을 280nm 에서의 흡광도가 0.05 OD 보다 더 낮을 때까지 똑같은 완충용액으로

세척한다. 결합된 효소활성물을 5 컬럼 부피 만큼 똑같은 완충용액의 직선염

구배(0 에서 0.5M NaCl)로 용출한다. 효소활성을 포함하는 분획들을 모은다.

단계 3: - 소수성 크로마토그래피. 효소활성을 포함하는 분획들의 몰농도를 고체

아세트산 암모늄을 첨가하여 0.8M로 조정한다.

0.8M 아세트산 암모늄으로 미리 평형된 TSK 겔 Butyl-Toyopearl 650C 컬럼(Tosoh

Corporation Japan 에서 구입가능)상에 효소를 적용한다.

결합되지 않은 물질을 0.8M 아세트산 암모늄으로 세척하고 결합된 물질을 증류수로

용출한다.

단계 4: - 리파제 활성을 포함하는 분획들을 물로 희석하여 콘덕턴스(conductance)

를 2mS 로 및 pH를 7 로 조정한다. 분획들을 50mM Tris- 아세트산 완충용액

(pH 7)으로 미리 평형된 High performance Q Sepharose (pharmacia) 컬럼상에 적용한다.

결합된 효소들 직선상염구배로 용출한다.

실시예 18

본발명의 리파제 변체의 세척능력

본발명의 Humicola lanuginosa 리파제 변체의 세척능력은 야생형 H. lanuginosa 리파

제에 비교된 OD 280에 따라 리티당 단백질 mg으로 효소 무어량의 기준하에 평가

되었다.

세척시도는 열안정수조에 놓인 150ml 비이커에서 수행되었다.

삼각형의 자석막대로 비이커를 교반하였다.

실험조건은 하기와 같다:

방법: 3사이클 (각 사이클 사이에서 하룻밤 동안 건조)

세척용액: 비이커당 100ml

견본: 비이커당 6견본 ($3.5 \times 3.5\text{cm}$)

직물: 100% 면화, 시험직물 스타일 #400

염색: 수단레드(Sudan red) 로 착색된 라드(0.75mg 염료/g 라드), 70°C 로 가열된

라드 $6\mu\text{l}$ 를 각 견본의 중앙에 적용하였다. 염색의 적용후 견본을 30분

동안 75°C 의 오븐에서 가열했다. 그 다음 첫번째 세척전에 실온에서 하룻밤

동안 견본을 보관하였다.

세정제: LAS (Nansa 1169/P, 30% a. m.) 1.17g/l

AEO (Dobanol 25-7) 0.15g/l

3인산나트륨 1.25g/l

황산나트륨 1.00g/l

탄산나트륨 0.45g/l

규산나트륨 0.15g/l

pH: 10.2

리파제농도: 리터당 리파제 단백질이 0.075, 0.188, 0.375, 0.75 및 2.5mg

시간: 20분

온도: 30°C

형균: 흐르는 수도물에서 15분

건조: 실온에서 하룻밤 동안 ($\sim 20^{\circ}\text{C}$, 30-50% RH)

평가: 세번째 세척 후에 460nm 에서의 반사율을 측정하였다.

결과

투여량- 반응곡선이 리파제 변체 및 본래의 *H. lanuginosa* 리파제에 대해서 비교되었다. 투여량- 반응곡선은 측정치를 하기의 식에 적용하여 계산되었다:

$$\Delta R = \Delta R_{\max} \frac{C^{0.5}}{K + C^{0.5}} \quad (I)$$

여기서 ΔR 은 반사율 단위로 표현된 효과이고

C 는 효소농도(mg/l)이고

ΔR_{\max} 는 최대효과를 표현하는 상수이고

K 는 하나의 상수이고; K^2 은 최대효과의 1/2 이 획득되는 효소농도를 나타낸다.

각 리파제 변체 뿐만아니라 야생형 리파제에 대해 발견된 특징적인 상수 ΔR_{\max} 및 K 에 근거하여, 개선인자(improvement factor)가 계산되었다.

(II) $f_{\text{개선}} = C_{\text{WT}}/C$ 로서 정의된 개선인자는 0.25mg/l의 기준 야생형 단백질(C_{WT})로 얻어지는 것과 똑같은 효과를 획득하는데 필요한 리파제 변체 단백질의 양을 표현한다.

그리하여 개선인자를 계산하는 방법은 하기와 같다:

(1) 0.25mg/l에서의 야생형 단백질의 효과($\Delta R_{\text{야생형}}$)는 식 (I)에 의하여 계산되었다:

(2) 0.25mg/l에서의 야생형과 똑같은 효과를 나타내는 리파제 변체의 농도는 하기의 식에 의하여 계산되었다:

$$C = (K_{(\text{변체})} \frac{\Delta R_{(\text{야생형})}}{\Delta R_{\max(\text{변체})} - \Delta R_{(\text{야생형})}})^2 \quad (III)$$

(3) 개선인자가 식 (II) 에 의하여 계산되었다.

이 결과가 하기의 표 1에 보여진다.

표 1

변체	개선인자
D96L	4.4
D111L	1.0
E87A	1.0
E56A	1.6
E56Q	2.6
R209A	1.1
D242N	1.7
R209A+E210A	1.9
R209A+E210A+D96L	2.8
E210Q+D242N+D254N	1.8
R209A+E210A+D96L+E56Q	1.5
L206A	1.0
L206V	1.6
L206S	1.3
F211L	1.0
F211I	1.1
F211A	
R209* + E210*	0.9

리파제 변체 R209A + E210A, E56Q 및 D96L은 야생형 리파제 보다 상당히 더 양호한 세척능력을 가진다는 것이 표 1로 부터 보여진다.

이것은 아마도 이 변체의 감소된 음전하 및 증가된 소수성에 의해 세척동안 흡착이 증가하고 결과적으로 건조단계 동안 보다 높은 활성을 나타내기 때문이다.

리파제 변체 E87A, D111N 및 R209A 의 능력은 야생형 효소의 능력과 같은 정도이다.

실시예 19

리파제 변체의 증가된 열안정성

H. lanuginosa 리파제의 선택된 변체의 열안정성은 미분 스캐닝 비색정량분석(Diffe-

rential Scanning Calorimetry) (DSC) 에 의하여 검사되었다.

이 기술을 이용하여 열변성온도, Td는 일정한 계획된 속도로 효소용액을 가열함으로써 결정되었다.

실험:

MicroCal Inc. 의 미분 스캐닝 비색계인 MC-2D 가 검사에 사용되었다.

하기의 pH- 값에서 50mM 완충용액이 제조되었다: 4 (아세트산), 7 (TRIS- 아세트산), 10 (글리신), 효소농도는 0.6-및 0.9mg/ml 사이의 범위였고 각 실험에 전체 부피 1.2ml 이 사용되었다. 모든 샘플은 90°C/ 시간의 스캐닝 속도에서 5°C 부터 95°C까지 가열되었다.

결과:

야생형 및 선택된 돌연변이체의 결과는 하기의 표에서 보여진다.

		pH 4		pH 7		pH 10	
No	돌연변이	Td	dTd	Td	dTd	Td	dTd
WT	-	58.9	-	74.7	-	69.3	-
1	F211A	60.2	+1.3	75.8	+1.1	70.3	+1.0
2	T267R	59.4	+0.5	75.7	+1.0	70.0	+0.7
3	D111N	58.3	-0.6	75.6	+0.9	69.9	+0.6
4	F211L	57.8	-1.1	74.8	0.1	69.4	0.1

여기서 dTd 는 돌연변이의 결과로서 열안정성의 변화를 나타낸다.

실시예 20

액체 세정제내에서 H. lanuginosa 리파제 변체의 저장 안정성

몇가지 변체들이 하기의 조성을 갖는 모델 액체 세정제에서 시험되었다:

		% w/w
음이온성	LAS	10
	AS	1
	비누	14
비이온성	AEO	13
용매	1,2-프로판디올	3
	에탄올	5
완충용액	TEA	6
연마제	시트르산나트륨	1
중화제	NaOH	2
안정화제 등	SXS	1
	Ca ²⁺	0,0025
	포스폰산	0,4
	Na ₂ SO ₄	0,2
물	100% 까지 첨가	
pH	8 또는 10	

세정제 그램당 1000LU가 첨가되었고 어떤 샘플에서는 0.025AU/g (Alcalase®) 이 첨가되었다. 샘플은 하기의 도해에 따라 보관되었다 (각각 3개씩):

보관온도	-18°C	30°C
세정제		
pH 8, 프로테아제 없음	2 & 7 일	2 & 7 일
pH 8, 0.025 AU/g		2 일
pH 10, 프로테아제 없음	7 일	7 일

이렇게 배양한 다음 샘플을 LU- 방법 (Novo Nordisk AF 95.5) 에 따라서 분석하였다.

리파제 활성의 감소가 일차 속도론을 따른다고 가정하면, 감소의 속도상수가 결정 될 수 있다:

$$A(t) = A_0 \cdot \exp(-k \cdot t)$$

A(t)는 시간 t에서의 효소활성이고, A₀는 초기활성이고 및 k는 일차속도 상수이다.

프로테아제를 포함하는 세정제에서 단백질 분해의 속도상수는

$$A(t) = A_0 \cdot \exp(-[k + k_p] \cdot t)$$

로부터 계산될 수 있다. 여기서 K_p는 단백질 분해의 속도상수이고, k는

프로테아제 없는 세정제에서 결정된 안정성 데이터로 부터 계산된다.

각 실험에서 야생형 H. lanuginosa 리파제는 기준으로서 포함되었고, 야생형과 변체의

비교는 단지 실험 사이의 편차의 불확실성을 감소시키기 위해 실험내에서 행해졌다.

하기에 결과가 주어져 있다. 야생형 보다 변체의 상대적인 개선은 하기와 같이 주어진다:

$$IF_x = K_{wt}/K_x$$

여기서 IF는 개선인자를 의미하고, K_{wt} 는 (주어진 조건에서) 야생형의 감소의 속도 상수이고 및 K_x 는 똑같은 실험에서 문제의 변체의 대응하는 속도상수이다.

IF는 반감기(half-life)의 상대적인 개선을 표현한다 ($IF_x = 2$ 는 변체 X의 반감기가 똑같은 실험에서 야생형의 반감기의 두배라는 것을 나타낸다).

실험내에서 반복시 편차의 평가에 근거하면, $IF < 0.7$ 또는 $IF > 1.3$ 은 중대하다고 여겨진다. k 는 단위는 $(일)^{-1}$ 이다.

변체	실험번호	pH 8 프로테아제 없음		pH 8 +Alcalase		pH 10 프로테아제 없음	
		k ^{*)}	IF ^{*)}	k _p	IF	k	IF
야생형	3	0.02		0.48		0.19	
	5	0.02		0.40		0.16	
	6	0.00		0.34		0.09	
	7	0.01		0.52		0.22	
	8	a	0.01	0.50		0.09	
		b	0.01	0.52		0.07	
D96N	3	0.00		0.21	2.3	0.15	1.3
	5	0.02		0.26	1.6	n.d.	
D111N	3	0.00		0.50	1.0	0.16	1.2
	5	0.02		0.31	1.3	0.13	1.2
E56Q	3	0.01		0.22	2.2	0.14	1.4
D96L	6	0.01		0.17	2.0	0.08	1.2
	7	0.00		0.23	2.3	0.09	2.6
R209A/E210A/D96L	7	0.02		0.36	1.4	0.10	2.3
E210Q/D242N/D254N	7	0.02		0.49	1.0	n.d.	
F211L	6	0.02		0.41	0.8	0.08	1.1
F211T	8	0.02		1.4	0.4	0.06	1.5
F211A	8	0.01		0.58	0.9	0.02	3.1
F211I	8	0.02		1.4	0.4	0.08	1.2

pH 8의 세정제에서 *) k는 모든 경우에 매우 낮고, 짧은 보관시간 때문에 (7일, 대략 90% 잔류활성) 그것은 매우 정확하게는 결정되지 않는다. 따라서 IF가 계산되지 않는다.

결론적으로 많은 시험한 변체들이 단백질 분해성 파괴에 대한 개선된 내성을 가졌고, 그것들은 거의 모두 알칼리 조건에 대한 개선된 내성을 가졌다.

실시에 21

비(比)활성

하기에서 보여지는 리파제 변체에 대해 야생형(wt) 보다 더높은 비활성(단위 양 당 단위시간당 절단된 기질분자의 양)이 측정되었다.

이것은 이 리파제가 보다 우수한 실제 기질분해 능력을 가진다는 것을 의미한다.

리파제들은 똑같은 방법으로 발효되고 정제되었다. 정제한 리파제를 표준

LU검사 (Analytical method, internal NOVO NORDISK number AF 95/6-GB 1991. 02. 07)로

검사하였다. 샘플을 두번 분석하였고, 평균값을 표로 나타냈다.

단백질의 양은 Shimadzu 분광광도계상에서 280nm 파장을 이용하여 광학농도(optical density)를 측정하여 평가되었다.

샘플은 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동에서 단일 밴드와 더불어, OD280 을 OD260 으로 나눈 비값이 1.6 보다 더 클때 순수하다고 간주되었다.

Humicola lanuginosa	비 (比) 활성 /OD280
D111N	4290*
E56A	4890*
L206V	4750
F211T	4550
F211V	5060
F211I	6686
R209*/E210*	6686
R209A/E210A/D96L	4818
wt	3790

* 단지 한번 검사함

서열 리스트

(1) 일반 정보

- (i) 출원인: 노보 노르디스크 아크티에 셀스카브
- (ii) 발명의 명칭: 리파제 변체
- (iii) 서열의 수: 2
- (iv) 통신주소:
 - (A) 수신인: 노보 노르디스크 아크티에 셀스카브
 - (B) 거리: 노보 알레
 - (C) 도시: 박스베르트
 - (E) 나라: 덴마크
 - (F) 우편번호: 2880
- (v) 컴퓨터 판독형태:
 - (A) 매체유형: 플로피디스크
 - (B) 컴퓨터: IBM PC 호환기종
 - (C) 운용체계: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) 소프트웨어: Patentin Release #1.0, 버전 #1.25
- (vi) 본 출원 데이터:
 - (A) 출원번호:
 - (B) 출원일:
 - (C) 분류:
- (vii) 선 출원 데이터:
 - (A) 출원번호: DK 2196/90
 - (B) 출원일: 1990년 9월 13일
- (vii) 선 출원 데이터:
 - (A) 출원번호: DK 2194/90
 - (B) 출원일: 1990년 9월 13일
- (vii) 선 출원 데이터:
 - (A) 출원번호: DK 2195/90
 - (B) 출원일: 1990년 9월 13일
- (viii) 대리인 정보:
 - (A) 이름: Thalsoe-Madsen, Birgit
 - (C) 참고/ 사건번호: 3520.204-WO
- (ix) 원격통신정보:
 - (A) 전화: +45 4444 8888
 - (B) 텔레팩스: +45 4449 3256
 - (C) 텔렉스: 37304

(2) 서열 ID NO : 1의 정보

(i) 서열특성:

- (A) 길이: 918 염기쌍
- (B) 유형: 핵산
- (C) 가닥: 단일
- (D) 형태: 선형

(ii) 분자유형: cDNA

(vi) 본래의 공급원:

- (A) 생물체: *Humicola lanuginosa*

(ix) 특성:

- (A) 이름/ 키: CDS
- (B) 위치: 1..873

(xi) 서열기술: SEQ ID NO:1:

```
ATG AGG AGC TCC CTT GTG CTG TTC TTT GTC TCT GCG TGG ACG GCC TTG 48
Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
1 5 10 15

GCC AGT CCT ATT CGT CGA GAG GTC TCG CAG GAT CTG TTT AAC CAG TTC 96
Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
20 25 30

AAT CTC TTT GCA CAG TAT TCT GCA GCC GCA TAC TGC GGA AAA AAC AAT 144
Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
35 40 45

GAT GCC CCA GCT GGT ACA AAC ATT ACG TGC ACG GGA AAT GCC TGC CCC 192
Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
50 55 60

GAG GTA GAG AAG GCG GAT GCA ACG TTT CTC TAC TCG TTT GAA GAC TCT 240
Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
65 70 75 80

GGA GTG GGC GAT GTC ACC GGC TTC CTT GCT CTC GAC AAC ACG AAC AAA 288
Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
85 90 95

TTG ATC GTC CTC TCT TTC CGT GGC TCT CGT TCC ATA GAG AAC TGG ATC 336
Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile
100 105 110

GGG AAT CTT AAC TTC GAC TTG AAA GAA ATA AAT GAC ATT TGC TCC GGC 384
Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly
115 120 125

TGC AGG GGA CAT GAC GGC TTC ACT TCG TCC TGG AGG TCT GTA GCC GAT 432
Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp
130 135 140
```

ACG TTA AGG CAG AAG GTG GAG GAT GCT GTG AGG GAG CAT CCC GAC TAT 480
 Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr
 145 150 155 160
 CGC GTG GTG TTT ACC GGA CAT AGC TTG GGT GGT GCA TTG GCA ACT GTT 528
 Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val
 165 170 175
 GCC GGA GCA GAC CTG CGT GGA AAT GGG TAT GAT ATC GAC GTG TTT TCA 576
 Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser
 180 185 190
 TAT GGC GCC CCC CGA GTC GGA AAC AGG GCT TTT GCA GAA TTC CTG ACC 624
 Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr
 195 200 205
 GTA CAG ACC GGC GGA ACA CTC TAC CGC ATT ACC CAC ACC AAT GAT ATT 672
 Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile
 210 215 220
 GTC CCT AGA CTC CCG CCG CGC GAA TTC GGT TAC AGC CAT TCT AGC CCA 720
 Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro
 225 230 235 240
 GAG TAC TGG ATC AAA TCT GGA ACC CTT GTC CCC GTC ACC CGA AAC GAT 768
 Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp
 245 250 255
 ATC GTG AAG ATA GAA GGC ATC GAT GCC ACC GGC GGC AAT AAC CAG CCT 816
 Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro
 260 265 270
 AAC ATT CCG GAT ATC CCT GCG CAC CTA TGG TAC TTC GGG TTA ATT GGG 864
 Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly
 275 280 285
 ACA TGT CTT TAGTGGCCGG CGCGGCTGGG TCCGACTCTA GCGAGCTCGA GATCT 918
 Thr Cys Leu
 290

(2) 서열 ID NO : 2의 정보:

(i) 서열특징:

- (A) 길이: 291 아미노산
- (B) 유형: 아미노산
- (D) 형태: 선형

(ii) 분자유형: 단백질

(xi) 서열기술: SEQ ID NO:2:

Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe

특허청구의 범위

1. 리파제 분자의 우세하게 소수성인 연장된 결합포켓내에 위치한 활성세린을 포함하는 트립신- 같은 촉매 3체를 함유하는 모(母) 리파제의 리파제 변체에 있어서, 가수분해시 또는 가수분해 동안 기질과의 상호작용에 참여할 수 있는 활성세린 잔기를 포함하는 리파제 구조부내에 위치한 잔기들을 함유하는 지질 접촉부의 정전기적 전하 및/ 또는 소수성이 하나 이상의 음전하 아미노산잔기를 중성의 또는 양전하의 아미노산잔기(들)에 의해 치환 또는 삭제함에 의하여, 및/ 또는 하나 이상의 중성의 아미노산 잔기를 양전하 아미노산잔기(들)에 의해 치환함에 의하여, 및/ 또는 하나 이상의 친수성 아미노산 잔기를 소수성 아미노산잔기(들)에 의해 치환 또는 삭제함에 의하여 변화되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
2. 제 1항에 있어서, 상기의 지질 접촉부의 하나 이상의 글루탐산, 아스파르트산 잔기가 글루타민, 아스파라긴, 알라닌, 류신, 발린, 세린, 트레오닌, 리신, 또는 아르기닌에 의해 치환되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
3. 제 1항 내지 제 2항중 어느 하나에 있어서, 모 리파제가 미생물의 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
4. 제 3항에 있어서, 모 리파제가 곰팡이의 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
5. 제 4항에 있어서, 모 리파제가 Humicola, 또는 Rhizomucor 균주로 부터 추출되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
6. 제 5항에 있어서, 모 리파제가 Rhizomucor miehei 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
7. 제 6항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환되는 것을

특징으로 하는 리파제 변체:

D91N, K, R, A, V, L, S, T;
D256N, K, R, A, V, L, S, T;
D226N, K, R, A, V, L, S, T;
D61N, K, R, A, V, L, S, T;
D113N, K, R, A, V, L, S, T;
E201Q, K, R, A, V, L, S, T;
D243N, K, R, A, V, L, S, T.

8. 제 5항에 있어서, 모 리파제가 Humicola lanuginosa 리파제인 것을 특징으로 하는

리파제 변체.

9. 제 8항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환되는 것을

특징으로 하는 리파제 변체:

E87Q, K, R, A, N, T, S, L, V;
D254N, K, R, A, Q, T, S, L, V;
D242N, K, R, A, Q, T, S, L, V;
E210Q, K, R, A, N, T, S, L, V;
E56Q, K, R, A, N, T, S, L, V;
D96N, K, R, A, Q, T, S, L, V;
D111N, K, R, A, Q, T, S, L, V;
D62A, Q, N, T, S, K, R, L, V;
E219A, Q, N, T, S, K, R, L, V;
E234A, Q, N, T, S, K, R, L, V;
E57A, Q, N, T, S, K, R, L, V;
E99A, Q, N, T, S, K, R, L, V;
D27A, Q, N, T, S, K, R, L, V; 또는
E239A, Q, N, T, S, K, R, L, V.

10. 제 9항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환되는 것을

특징으로 하는 리파제 변체:

E87Q + D254N + D242N + E210Q;
E87Q + D254N + E210Q;
D96N + E87Q + D254N;
R209A + E210A.

11. 제 8항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체:

T267K,R;
S85K,R;
T226K,R;
N88K,R;
N92K,R;
I255K,R;
I202K,R
L206K,R;
L259K,R;
V203K,R; 또는
L227K,R

12. 제 4항에 있어서, 모 리파제가 호모 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

13. 제12항에 있어서, 모 리파제가 Candida 균주로 부터 추출되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

14. 제 3항에 있어서, 모 리파제가 세균의 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

15. 제14항에 있어서, 모 리파제가 Pseudomonas 균주로 부터 추출되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

16. 리파제 분자의 우세하게 소수성인 연장된 결합포켓내에 위치한 활성세린을 포함 하는 트립신- 같은 촉매 3체를 함유하는 리파제 변체에 있어서, 상기의 리파제 변체가 지질 접촉부의 표면형태를 변화시키기 위해서 가수분해시 또는 가수분해 동안 기질과의 상호작용에 참여하는 활성세린 잔기를 포함하는 리파제 구조부내에 위치한 잔기들을 함유하는 지질 접촉부의 시열을 구성하는 하나 이상의 아미노산 잔기의 위치에 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환, 삭제, 또는 삽입된 것을 특징

으로 하는 리파제 변체.

17. 제16항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하나 이상의 다른 덜 부피 있는 아미노산 잔기에 의하여 치환된 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
18. 제17항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 발린, 트레오닌, 세린, 글리신, 또는 알라닌에 의해 치환된 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
19. 제16항에 있어서, 지질 접촉부내의 고리서열부를 형성하는 하나 이상의 아미노산 잔기가 삭제된 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
20. 제19항에 있어서, 2-8, 특히 2-6 아미노산 잔기가 지질 접촉부내의 하나 이상의 고리서열로 부터 삭제된 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
21. 제16항 내지 제20항중 어느 하나에 있어서, 모 리파제가 미생물의 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
22. 제21항에 있어서, 모 리파제가 곰팡이의 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
23. 제22항에 있어서, 모 리파제가 Humicola 또는 Rhizomucor 균주로 부터 추출되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
24. 제23항에 있어서, 모 리파제가 Rhizomucor miehei 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
25. 제24항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체:

I204V,A,T,S,G;

L208V,A,T,S,G;

F213V,A,T,S,G; 또는

I254V,A,T,S,G

26. 제24항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기의 위치중 하나 이상에서 삭제된 것을 특징으로 하는 리파제 변체:

82-113, 211-215, 235-243, 245-269 또는 264-269

27. 제26항에 있어서, 하기와 같이 변형된 것을 특징으로 하는 리파제 변체:

N264* + T265* + G266* + L267* + C268* + T269* + C22T.

28. 제26항에 있어서, 하기의 아미노산 잔기가 삭제된 것을 특징으로 하는 리파제 변체:

F213* + F215*;

D238* + L239* + E240* + D243*; 또는

F251* + T252* + S247*

29. 제23항에 있어서, 모 리파제가 Humicola lanuginosa 리파제인 것을 특징으로

하는 리파제 변체.

30. 제29항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환된 것을 특징으로 하는 리파제 변체:

I202V,A,T,S,G;

L206V,A,T,S,G;

F211V,A,T,S,G,I; 또는

I255V,A,T,S,G

31. 제29항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기의 위치중 하나 이상에서 삭제된 것을 특징으로 하는 리파제 변체:

84-112, 209-213, 238-245, 247-254 또는 264-269.

32. 제31항에 있어서, 하기와 같이 변형된 것을 특징으로 하는 리파제 변체:

L264* + I265* + G266* + T267* + C268* + L269* + C22T.

33. 제31항에 있어서, 하기의 아미노산 잔기가 삭제된 것을 특징으로 하는 리파제 변체:

R209* + E210*;

F211* + Y213*;

D242* + E239* + I241*; 또는

N247* + D254*

34. 제21항에 있어서, 모 리파제가 호모 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

35. 제34항에 있어서, 모 리파제가 Candida 균주로 부터 추출되는 것을 특징으로

하는 리파제 변체.

36. 제21항에 있어서, 모 리파제가 세균의 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

37. 제36항에 있어서, 모 리파제가 Pseudomonas 균주로 부터 추출되는 것을 특징으로

하는 리파제 변체.

38. (i) 리파제 분자의 우세하게 소수성인 연장된 결합포켓내에 위치한 활성세린을

포함하는 트립신- 같은 촉매 3체 및 (ii) 리파제가 불활성 형태일때 활성세린을

덮고 리파제가 활성세린을 지질 기질에 접근가능하게 만들기 위해 활성화될때

그것의 형태를 변화시키는 표면고리구조, 여기서 고리구조는 결합포켓에 면한 우세

하게 소수성인 안쪽 표면과 우세하게 친수성인 바깥쪽 표면을 가지는 것을 함유

하는 유형의 리파제 변체에 있어서, 상기의 리파제 변체가 가수분해시 또는 가수

분해 동안 기질과의 상호작용 또는 표면고리구조를 이동시키는 것에 참여하는

활성세린 잔기를 포함하는 리파제 구조부내에 위치한 잔기들을 함유하는 지질

접촉부 서열을 구성하는 및/ 또는 고리구조의 서열을 구성하는 하나 이상의 아미

노산 잔기의 위치에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환, 삭제 또는 삽입된

것을 특징으로 하는 리파제 변체.

39. 제38항에 있어서, 고리구조의 적어도 하나의 아미노산 잔기가 시스테인에 의해

치환되고, 및 적어도 하나의 다른 아미노산 잔기가 시스테인에 의해 치환되고, 두 시스테인 잔기가 서로서로에 대해 이황화물 결합을 형성하도록 위치되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

40. 제38항 또는 제39항에 있어서, 모 리파제가 미생물의 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

41. 제38항 내지 제40항중 어느 하나에 있어서, 모 리파제가 곰팡이의 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

42. 제41항에 있어서, 모 리파제가 Humicola 또는 Rhizomucor 균주로 부터 추출되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

43. 제42항에 있어서, 모 리파제가 Rhizomucor miehei 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

44. 제43항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체:

S114C + A90C
R86C + D61C;
S84C + D61C;
N87C + D61C;
Y60C + R78C; 또는
Y60C + N87C

45. 제43항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체:

I204V, T, S, A, G;
L208V, T, S, A, G;
V254V, T, S, A, G;
L255V, T, S, A, G;
L258V, T, S, A, G;
L267V, T, S, A, G;

F94L,T,K; 또는

F213L,T,K

46. 제43항에 있어서, 하기의 아미노산 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 리파제

변체:

I204T + L255T + L267T; 또는

L208T + V254T + L258T

47. 제42항에 있어서, 모 리파제가 Humicola lanuginosa 리파제인 것을 특징으로 하는

리파제 변체.

48. 제47항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환되는 것을

특징으로 하는 리파제 변체:

G61C + N88C;

G61C + E87C;

D62C + E87C;

D62C + S85C;

D62C + N88C; 또는

S116C + G91C

49. 제47항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환되는 것을

특징으로 하는 리파제 변체:

L93V,T,S,A,G;

I90V,T,S,A,G;

I86V,T,S,A,G;

I202V,T,S,A,G;

L206V,T,S,A,G;

I255V,T,S,A,G;

L259V,T,S,A,G;

I265V,T,S,A,G;

F95L,T,K; 또는

F211L,T,K

50. 제49항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환되는 것을

특징으로 하는 리파제 변체:

F95K;
 I86T;
 I90T;
 I255T;
 L259T;
 L206T; 또는
 L206T + I255T + L259T

51. 제40항에 있어서, 모 리파제가 효모 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
52. 제51항에 있어서, 모 리파제가 Candida 균주로 부터 추출되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
53. 제40항에 있어서, 모 리파제가 세균의 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
54. 제53항에 있어서, 모 리파제가 Pseudomonas 균주로 부터 추출되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
55. 제 1항 내지 제54항중 어느 하나에 따른 리파제 변체를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 구조체.
56. 제55항에 따른 DNA 구조체를 운반하는 제조함 발현벡터.
57. 제55항에 따른 DNA 구조체 또는 제56항에 따른 벡터로 형질전환된 세포.
58. 제57항에 있어서, 곰팡이 세포, 예컨대 A. niger, A. oryzae 또는 A. nidulans 따위의 속 Aspergillus 에 속하는 곰팡이세포; 효모세포, 예컨대 S. cerevisiae 따위의 Saccharomyces 균주에 속하는 효모세포, 또는 H. polymorpha 따위의 속 Hansenula 의 또는 P. pastoris 따위의 속 Phichia 의 메틸로트로픽 효모(methylotrophic yeast); 또는 세균세포, 예컨대 B. subtilis, 또는 B. lentus 따위의 Bacillus 균주에 속하는

세균 세포인 것을 특징으로 하는 세포.

59. 제57항에 있어서, 식물세포, 예컨대 Solanum tuberosum, 또는 Nicotiana tabacum

따위의 Solanaceae에 속하는 식물세포인 것을 특징으로 하는 세포.

60. 제59항에 따른 세포를 함유하는 식물.

61. 제 1항 내지 제54항중 어느 하나에 따른 리파제 변체의 제조방법에서, 제57항

내지 제59항중 어느 하나에 따른 세포, 또는 제60항에 따른 식물이 리파제 변체의 제조에 도움이 되는 조건하에서 배양 또는 성장되고 그 다음에 리파제 변체가 배양물 또는 식물체로부터 회수되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체 제조방법.

62. 제 1항 내지 제54항중 어느 하나에 따른 리파제 변체를 포함하는 세정제 첨가물에서, 선택적으로 비-살포성 과립, 안정화된 액체 또는 보호된 효소의 형태의 세정제 첨가물.

63. 제62항에 있어서, 첨가물 g당 효소 단백질을 0.02-200mg 포함하는 것을 특징으로 하는 세정제 첨가물.

64. 제62항 또는 제63항에 있어서, 부가적으로 프로테아제, 아밀라제, 피옥시다제 및/또는 셀룰라제 따위의 다른 효소를 포함하는 것을 특징으로 하는 세정제 첨가물.

65. 제 1항 내지 제54항중 어느 하나에 따른 리파제 변체를 함유하는 세정제 조성물.

66. 제65항에 있어서, 부가적으로 프로테아제, 아밀라제, 피옥시다제 및/또는 셀룰라제 따위의 다른 효소를 포함하는 것을 특징으로 하는 세정제 조성물.

요 약 서

포켓이 지질접촉 부위의 부분을 형성하고 지질접촉부에 의해 둘러싸인 리파제 분자의 우세하게 소수성인 연장된 결합포켓내에 위치한 활성새틴을 포함하는 트립신-같은 촉매 3체를 함유하는 리파제가 지질접촉부의 정전기적 전하 및/ 또는 소수성을 변화시키기 위해서 또는 리파제의 지질접촉부의 표면형태를 변화시키기 위해서 지질접촉부내의 하나 이상의 아미노산 잔기의 삭제 또는 치환에 의해 돌연변이 되었다.

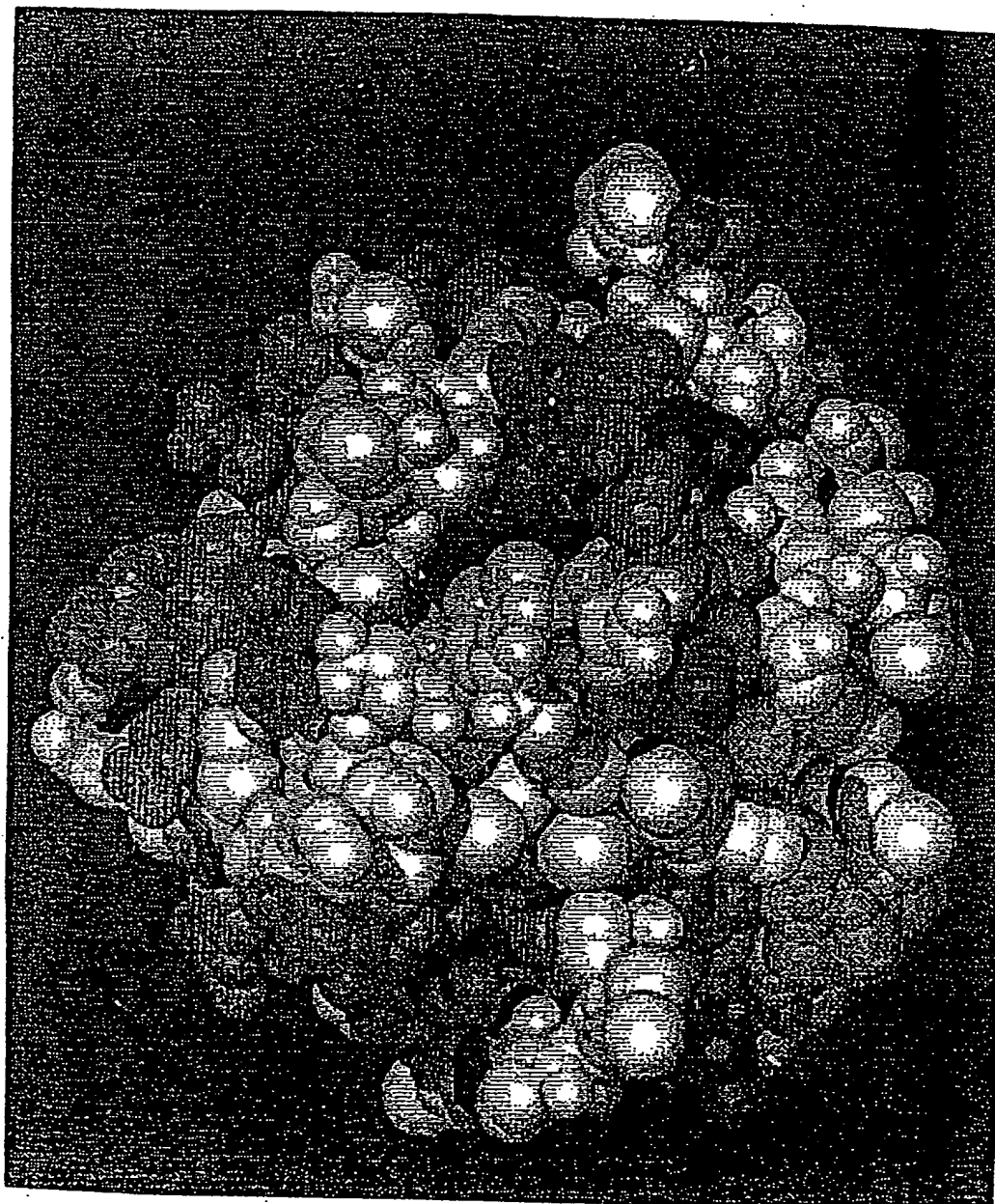


Fig. 1a

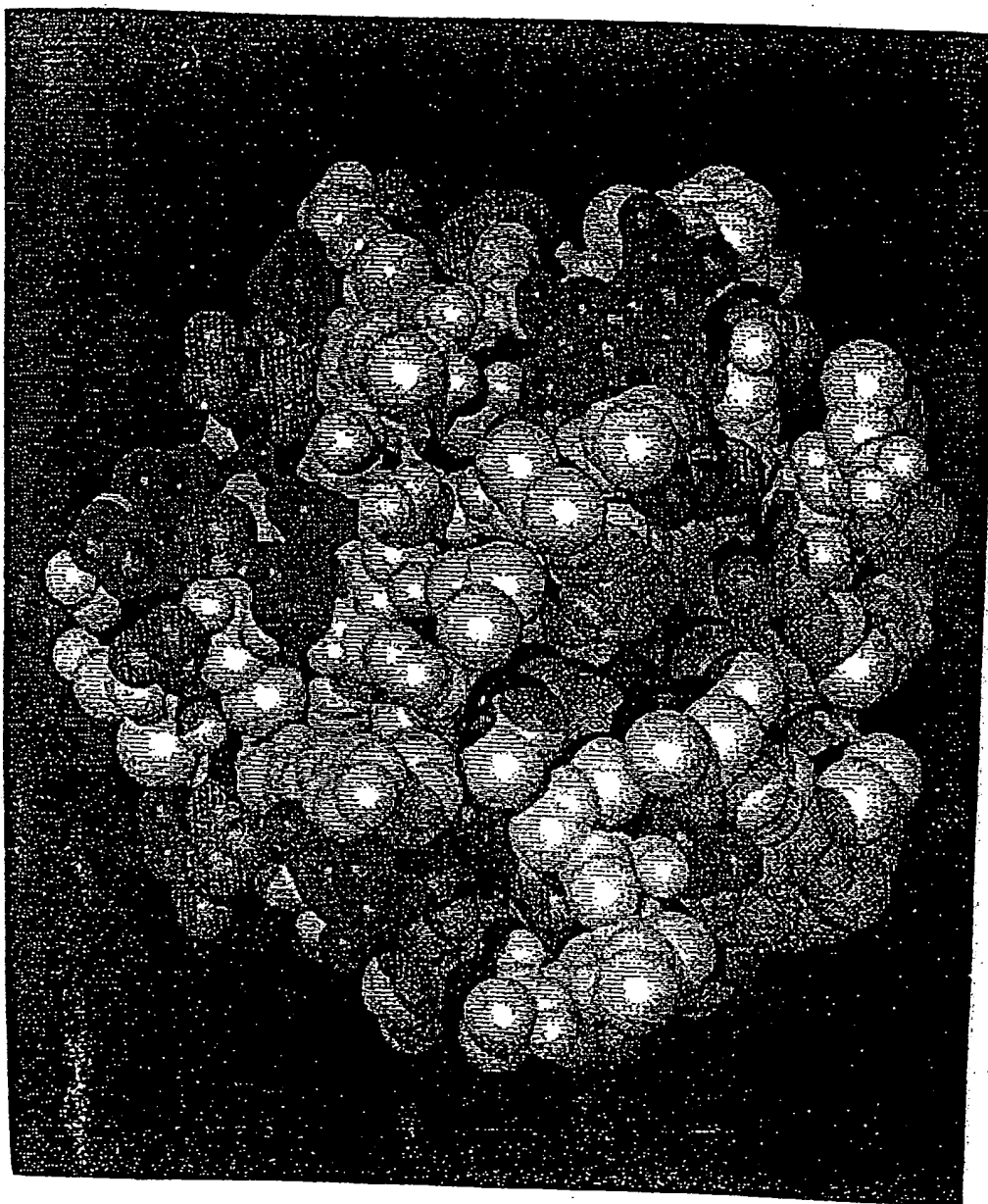


Fig. 1b

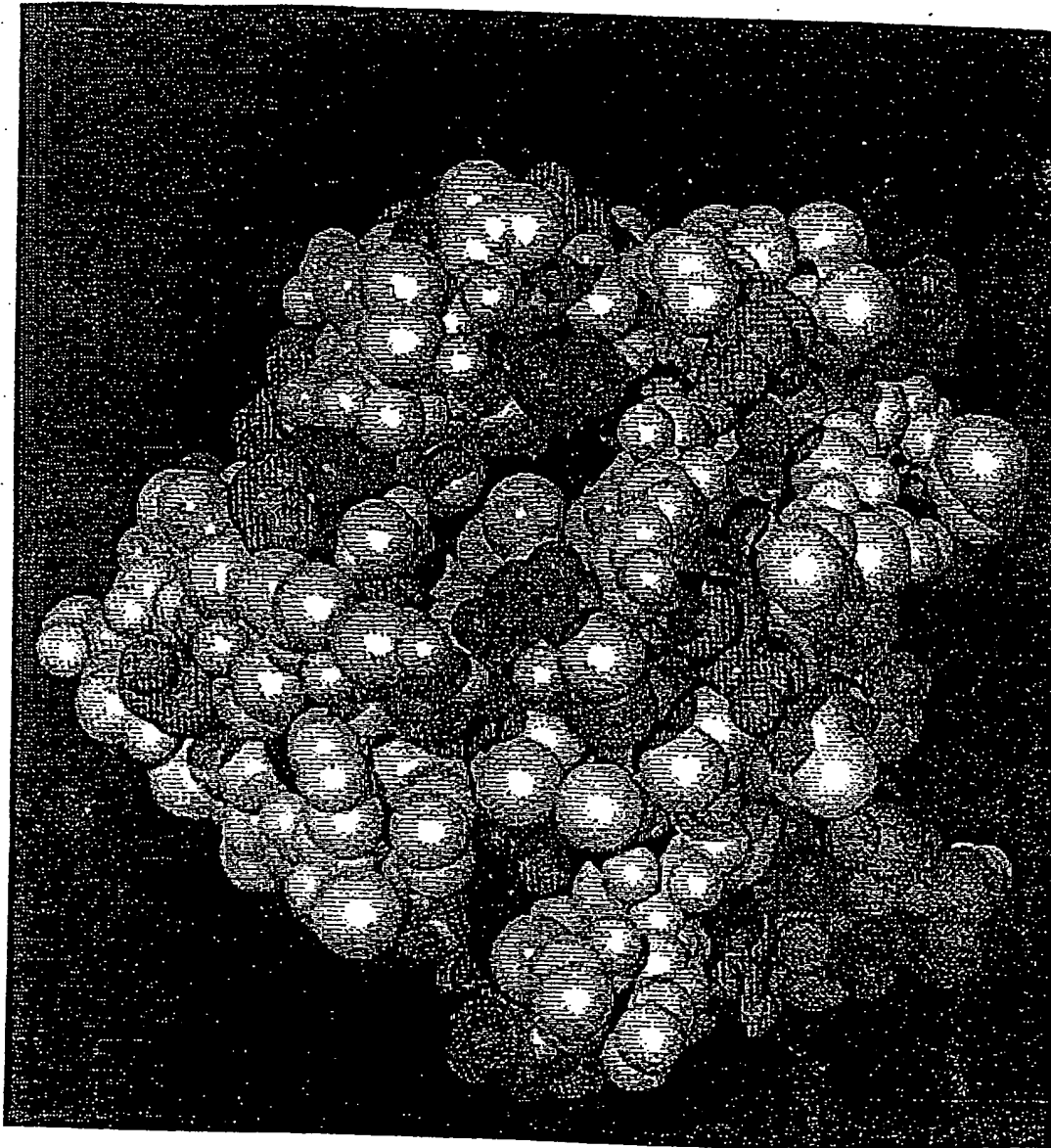


Fig. 2a

4/9

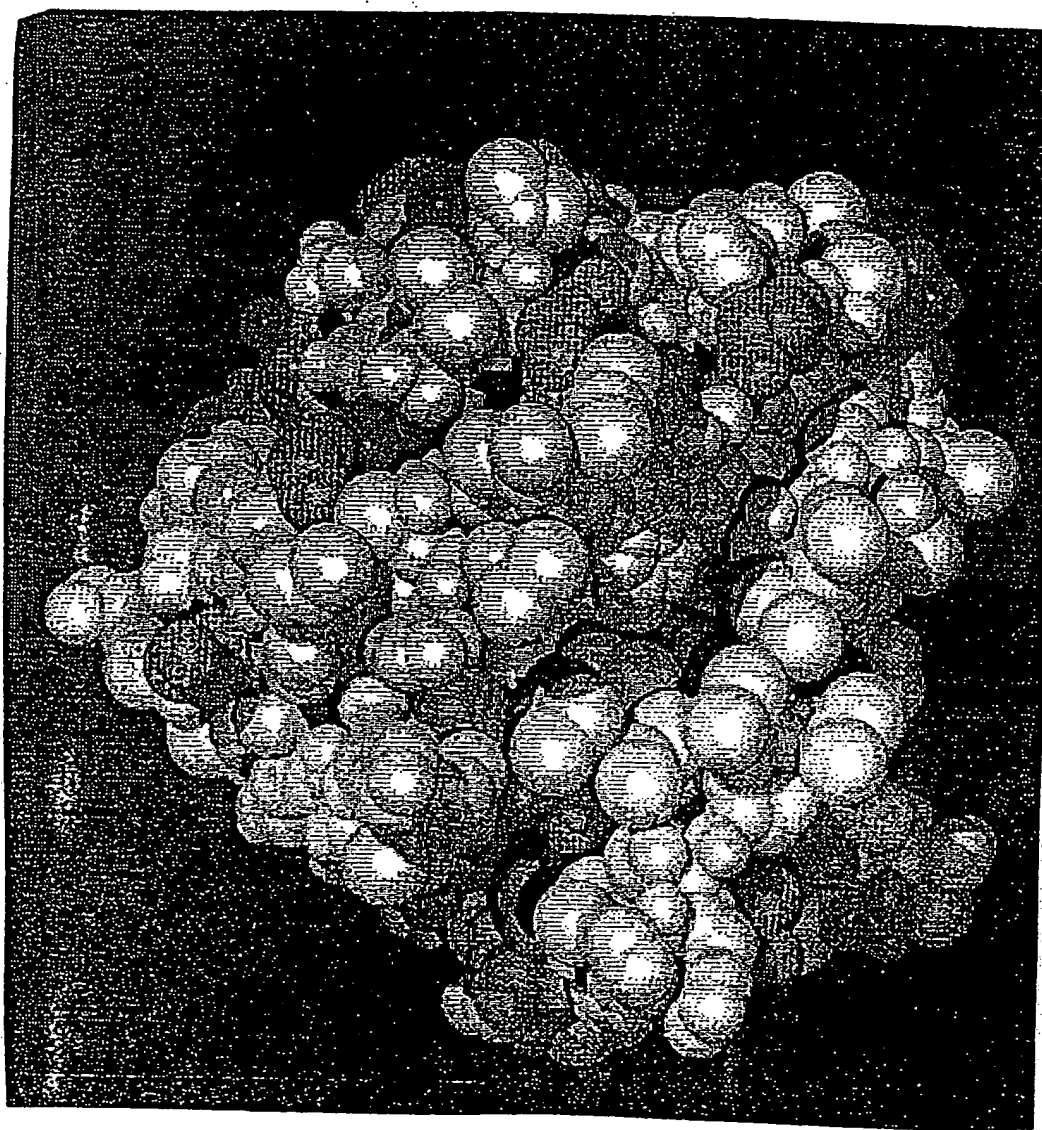


Fig. 2b

a-11

NZAS-0024496

5/9

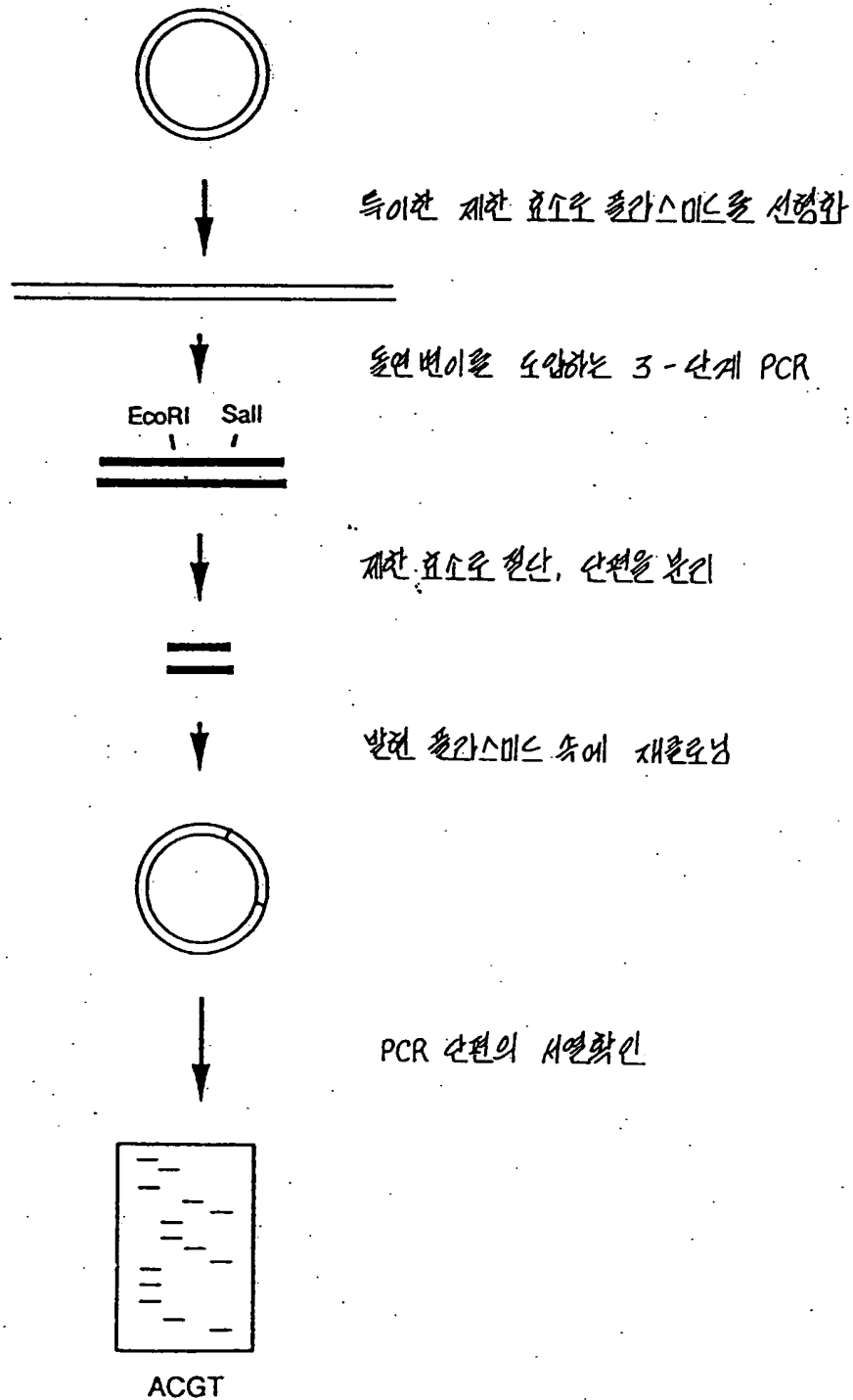


Fig. 3

9-5

6/9

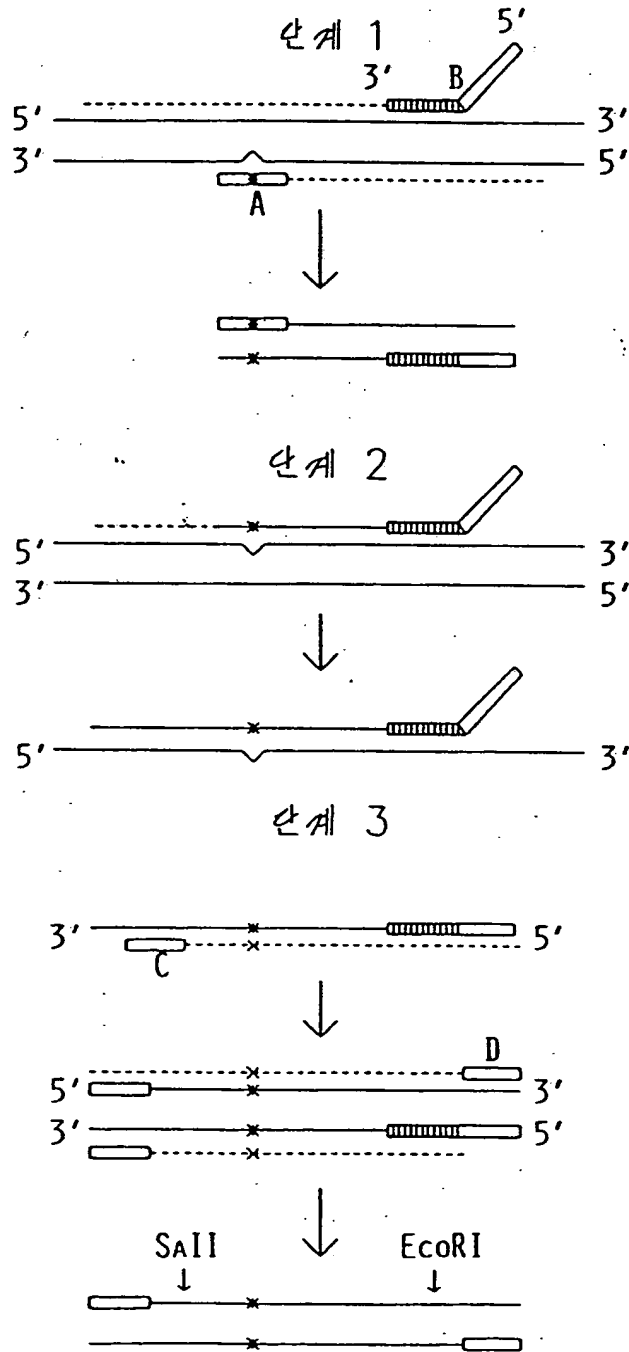


Fig. 4

9-6.

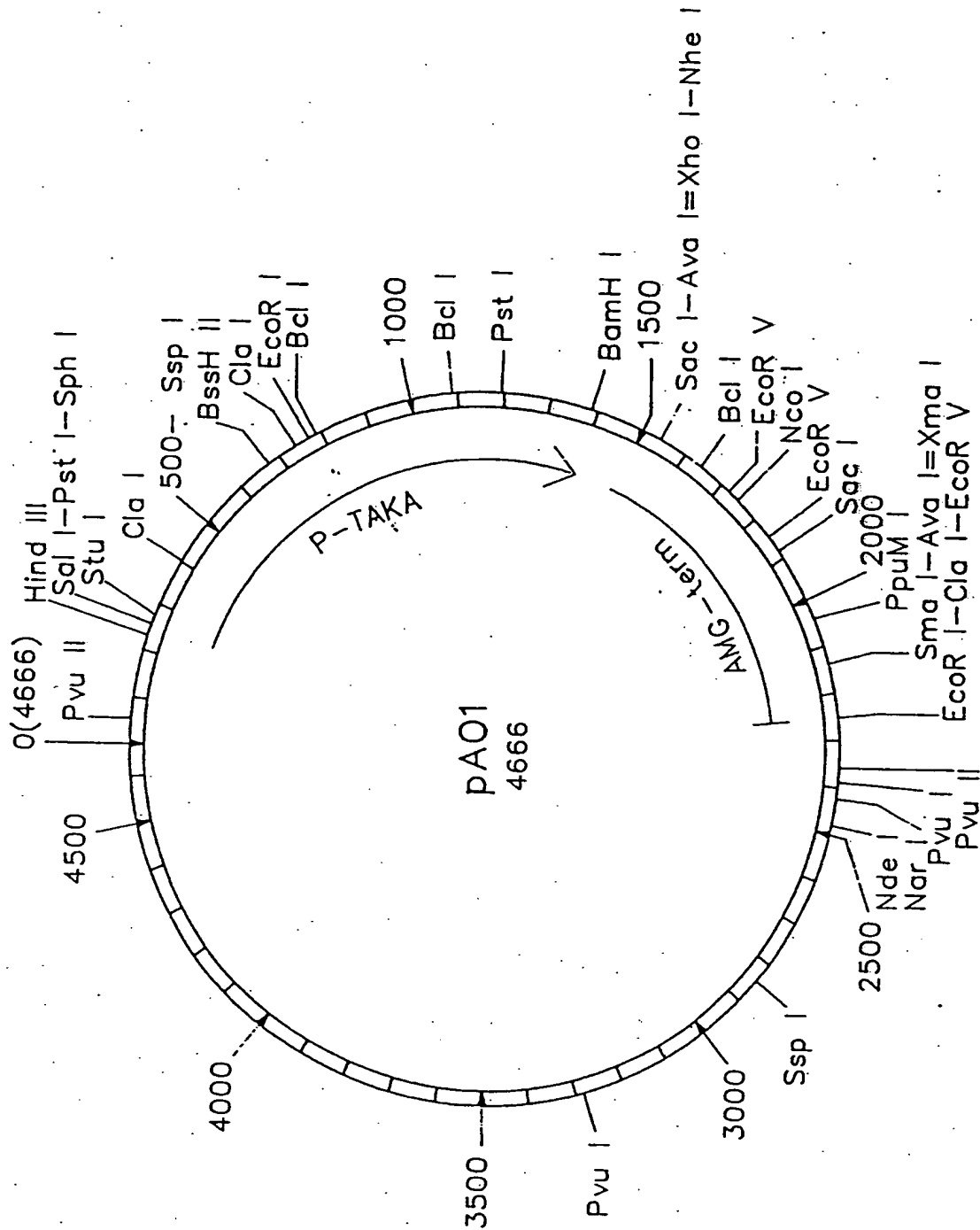


Fig. 5

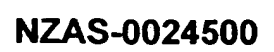


Fig. 6

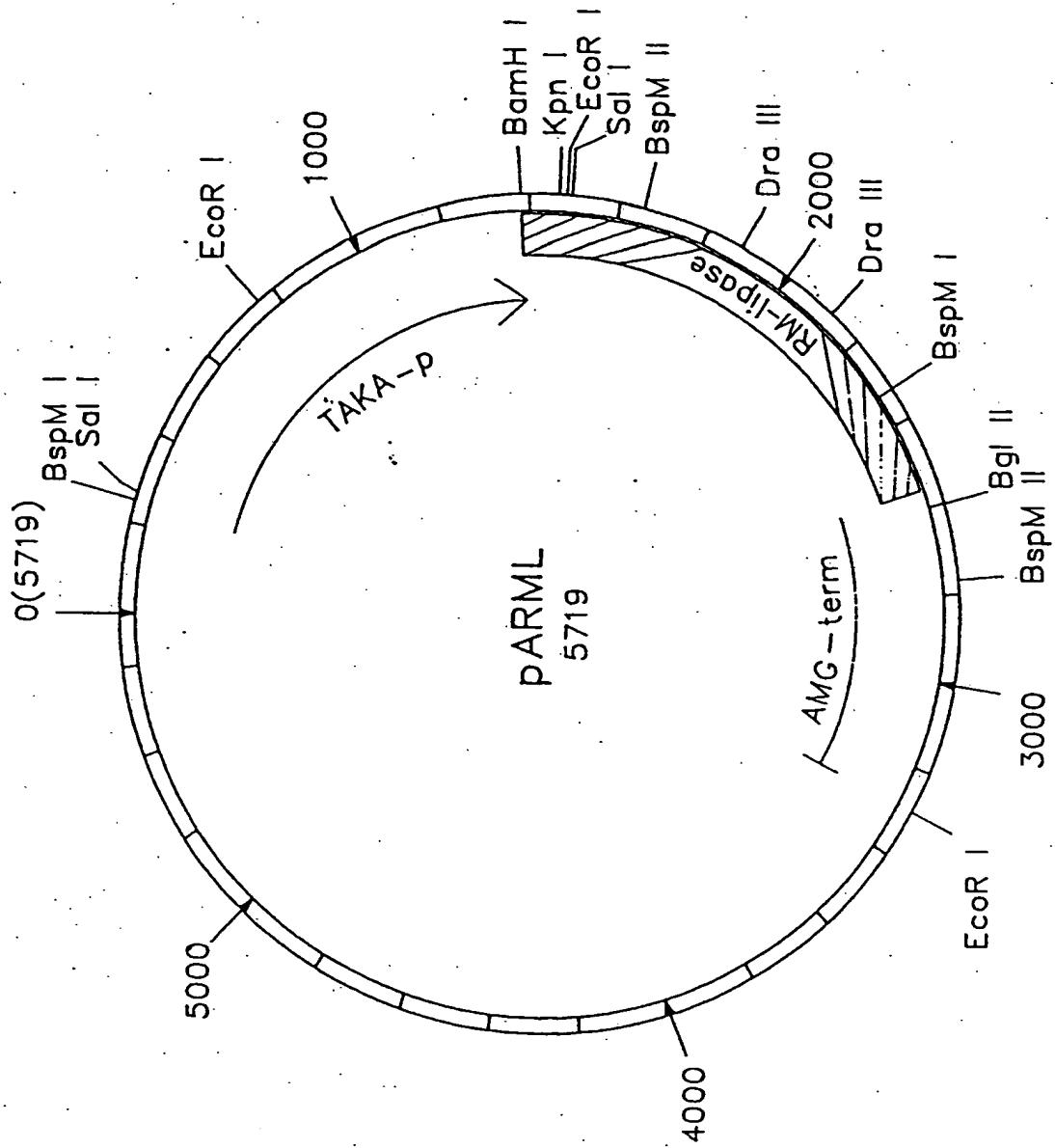


Fig. 7

Y. S. CHANG & ASSOCIATES
K.P.O. Box 136, Seoul 110, Korea

POWER OF ATTORNEY

I/We, the undersigned,

Novo Nordisk A/S

Patent Department

whose address is **Novo Allé**

DK-2880 Bagsværd

hereby appoint Mr. Yong Shik CHANG, Dae Sun LEE
registered Patent Attorney(s) in Seoul, Korea, as my/our attorney, with full power of substitution
and revocation, to file with the Korean Industrial Property Office application(s) for the registration
of patent/utility model/industrial design/trademark/service mark entitled

Lipase Variants

and further empower the said attorney(s) to file amendment, petition for the examination,
withdrawal, abandonment or alteration of application, divisional application, withdrawal of
application for the registration of extension of the patent term, and withdrawal of demands or
requests, to make claim or withdrawal of the priority under Article 55-1 of the Patent Law
(inclusive of application mutatis mutandis under Article 11 of the Utility Model Law), to file
recordal of alteration of address or name of the applicant(s), transfer of right, opposition, trial,
retrial, appeal against final rejection of application, decision for dismissing amendment or decision
in the first trial, and renewal application, to raise petition or administrative suit against any
administrative disposition of the Commissioner, to pay annuities or taxes, to represent me/us in a
litigation relating to the protection of industrial property or civil affairs, to do all lawful acts with
and without relation to the justice that shall be taken at the court of justice or administrative
authorities for the defense against infringements of industrial property, and to register as an
administrator of patent/utility model/industrial design/trademark/service mark under Article 5 of
the Patent Law, before and after the registration of such right(s).

Novo Nordisk A/S

This..... 15 day of..... FEB 19 93

Signed by: 

(in block letters) **Anne Secher**

Title: **Director of Patent Department**

(No legalization required)

AMENDMENT

Filed by	Name	Novo Nordisk A/S					
	Relation to the case	Applicant	Nationality	Denmark			
	Address	Novo Allé DK-2880 Bagsvaerd Denmark					
Attorney	Y. S. Chang D. S. Lee						
International application number	PCT/DK91/00271						
International application date	Sept. 13, 1991						
Title of Invention	Lipase Variants						
International filing date of amendment	Nov. 23, 1992						
<p>We are filing this amendment pursuant to Article 115 of the Enforcement Regulation of the Korean Patent Law.</p> <p style="text-align: right;">Date : March 13, 1993</p> <p style="text-align: right;">Y. S. Chang Patent Attorney (& One Other)</p> <p>To : Commissioner Korea Industrial Property Office</p>							
Attached Document	1. Translation of Amendment Original 1 copy Duplicate 2 copies						

보정된 특허청구의 범위

1. 리파제 분자의 우세하게 소수성인 연장된 결합포켓내에 위치한 활성새턴을 포함하는 트립신- 같은 촉매 3체를 함유하는 모(母) 리파제의 효소적으로 활성이 있는 리파제 변체에 있어서, 상기 변체 리파제가 만일 위치 127의 Gln 이 Arg 으로 치환되었고 및/ 또는 위치 207의 Phe 잔기가 Thr, Gly, Lys 또는 Ala 으로 치환된 EP 0 375 102에서 기술된 Pseudomonas putida 리파제의 변체들과 다르다면, 가수분해시 또는 가수분해 동안 기질과의 상호작용에 참여할 수 있는 활성새턴 잔기를 포함하는 리파제 구조부내에 위치한 잔기들을 함유하는 지질접촉부의 정전기적 전하 및/ 또는 소수성이 하나 이상의 음전하 아미노산 잔기를 중성의 또는 양전하의 아미노산 잔기(들)에 의해 치환 또는 삭제함에 의하여, 및/ 또는 하나 이상의 중성의 아미노산 잔기를 양전하 아미노산 잔기(들)에 의해 치환함에 의하여, 및/ 또는 하나 이상의 친수성 아미노산 잔기를 소수성 아미노산 잔기(들)에 의해 치환 또는 삭제함에 의하여 변화되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
2. 제 1항에 있어서, 상기의 지질 접촉부의 하나 이상의 글루탐산, 아스파르트산 잔기가 글루타민, 아스파라긴, 알라닌, 류신, 발린, 세린, 트레오닌, 리신, 또는 아르기닌에 의해 치환되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
3. 제 1항 내지 제 2항중 어느 하나에 있어서, 모 리파제가 미생물의 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
4. 제 3항에 있어서, 모 리파제가 곰팡이의 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.
5. 제 4항에 있어서, 모 리파제가 Humicola, 또는 Rhizomucor 균주로 부터 추출되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

6. 제 5항에 있어서, 모 리파제가 Rhizomucor miehei 리파제인 것을 특징으로 하는

리파제 변체.

7. 제 6항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환되는 것을

특징으로 하는 리파제 변체:

D91N, K, R, A, V, L, S, T;

D256N, K, R, A, V, L, S, T;

D226N, K, R, A, V, L, S, T;

D61N, K, R, A, V, L, S, T;

D113N, K, R, A, V, L, S, T;

E201Q, K, R, A, V, L, S, T;

D243N, K, R, A, V, L, S, T.

8. 제 5항에 있어서, 모 리파제가 Humicola lanuginosa 리파제인 것을 특징으로 하는

리파제 변체.

9. 제 8항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환되는 것을

특징으로 하는 리파제 변체:

E87Q, K, R, A, N, T, S, L, V;

D254N, K, R, A, Q, T, S, L, V;

D242N, K, R, A, Q, T, S, L, V;

E210Q, K, R, A, N, T, S, L, V;

E56Q, K, R, A, N, T, S, L, V;

D96N, K, R, A, Q, T, S, L, V;

D111N, K, R, A, Q, T, S, L, V;

D62A, Q, N, T, S, K, R, L, V;

E219A, Q, N, T, S, K, R, L, V;

E234A, Q, N, T, S, K, R, L, V;

E57A, Q, N, T, S, K, R, L, V;

E99A, Q, N, T, S, K, R, L, V;

D27A, Q, N, T, S, K, R, L, V; 또는

E239A, Q, N, T, S, K, R, L, V.

10. 제 9항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환되는 것을

특징으로 하는 리파제 변체:

E87Q + D254N + D242N + E210Q;

E87Q + D254N + E210Q;

D96N + E87Q + D254N;

R209A + E210A.

11. 제 8항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환되는 것을

특징으로 하는 리파제 변체:

T267K,R;

S85K,R;

T226K,R;

N88K,R;

N92K,R;

I255K,R;

I202K,R

L206K,R;

L259K,R;

V203K,R; 또는

L227K,R

12. 제 4항에 있어서, 모 리파제가 효모 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

13. 제12항에 있어서, 모 리파제가 Candida 균주로 부터 추출되는 것을 특징으로

하는 리파제 변체.

14. 제 3항에 있어서, 모 리파제가 세균의 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제
변체.

15. 제14항에 있어서, 모 리파제가 Pseudomonas 균주로 부터 추출되는 것을 특징으로
하는 리파제 변체.

16. 리파제 분자의 우세하게 소수성인 연장된 결합포켓내에 위치한 활성세린을 포함
하는 트립신- 같은 촉매 3체를 함유하는 모 리파제의 리파제 변체에 있어서, 상기

의 리파제 변체가 지질접촉부의 표면형태를 변화시키기 위해서 가수분해시 또는 가수분해 동안 기질과의 상호작용에 참여하는 활성세린 잔기를 포함하는 리파제 구조부내에 위치한 잔기들을 함유하는 지질접촉부의 고리서열부를 형성하는 하나 이상의 아미노산 잔기가 삭제된 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

17. 제16항에 있어서, 2-8, 특히 2-6 아미노산 잔기가 지질접촉부의 하나 이상의 고리서열로 부터 삭제되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

18. 제16항 또는 제17항중 어느 하나에 있어서, 모 리파제가 미생물의 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

19. 리파제 분자의 우세하게 소수성인 연장된 결합포켓내에 위치한 활성세린을 포함하는 트립신- 같은 촉매 3체를 함유하는 모 비- 세균의 리파제의 효소적으로 활성이 있는 변체에 있어서, 상기의 리파제 변체가 지질접촉부의 표면형태를 변화시키기 위해서 가수분해시 또는 가수분해 동안 기질과의 상호작용에 참여하는 활성세린 잔기를 포함하는 리파제구조부내에 위치한 잔기들을 함유하는 지질접촉부 서열을 구성하는 하나 이상의 아미노산 잔기의 위치에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환, 삭제, 또는 삽입된 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

20. 제18항 또는 제19항에 있어서, 모 리파제가 곰팡이의 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

21. 제19항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하나 이상의 다른 덜 부피 있는 아미노산 잔기에 의해 치환된 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

22. 제21항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 발린, 트레오닌, 세린, 글리신, 또는 알라닌에 의해 치환된 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

23. 제20항에 있어서, 모 리파제가 Humicola 또는 Rhizomucor 균주로 부터 추출되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

24. 제23항에 있어서, 모 리파제가 Rhizomucor miehei 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

25. 제24항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체:

I204V,A,T,S,G;
L208V,A,T,S,G;
F213V,A,T,S,G; 또는
I254V,A,T,S,G

26. 제24항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기의 위치중 하나 이상에서 삭제된 것을 특징으로 하는 리파제 변체:

82-113, 211-215, 235-243, 245-269 또는 264-269

27. 제26항에 있어서, 하기와 같이 변형된 것을 특징으로 하는 리파제 변체:

N264* + T265* + G266* + L267* + C268* + T269* + C22T.

28. 제26항에 있어서, 하기의 아미노산 잔기가 삭제된 것을 특징으로 하는 리파제 변체:

F213* + F215*;
D238* + L239* + E240* + D243*; 또는
F251* + T252* + S247*

29. 제23항에 있어서, 모 리파제가 Humicola lanuginosa 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

30. 제29항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환된 것을 특징으로 하는 리파제 변체:

I202V,A,T,S,G;
L206V,A,T,S,G;
F211V,A,T,S,G,I; 또는
I255V,A,T,S,G

31. 제29항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기의 위치중 하나 이상에서 삭제된 것을 특징으로 하는 리파제 변체:

84-112, 209-213, 238-245, 247-254 또는 264-269.

32. 제31항에 있어서, 하기와 같이 변형된 것을 특징으로 하는 리파제 변체:

L264* + I265* + G266* + T267* + C268* + L269* + C22T.

33. 제31항에 있어서, 하기의 아미노산 잔기가 삭제된 것을 특징으로 하는 리파제 변체:

R209* + E210*;

F211* + Y213*;

D242* + E239* + I241*; 또는

N247* + D254*

34. 제18항 또는 제19항에 있어서, 모 리파제가 호모 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

35. 제34항에 있어서, 모 리파제가 Candida 균주로 부터 추출되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

36. 제16항에 있어서, 모 리파제가 세균의 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

37. 제16항에 있어서, 모 리파제가 Pseudomonas 균주로 부터 추출되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

38. (i) 리파제 분자의 우세하게 소수성인 연장된 결합포켓내에 위치한 활성세린을 포함하는 트립신- 같은 촉매 3체 및 (ii) 리파제가 불활성 형태일때 활성세린을 덮고 리파제가 활성세린을 지질 기질에 접근가능하게 만들기 위해 활성화될때 그것의 형태를 변화시키는 표면고리구조, 여기서 고리구조는 결합포켓에 면한 우세

하계 소수성인 안쪽 표면과 우세하게 친수성인 바깥쪽 표면을 가지는 것을 함유하는 유형의 리파제 변체에 있어서, 상기의 리파제 변체가 가수분해시 또는 가수분해 동안 기질과의 상호작용 또는 표면고리구조를 이동시키는 것에 참여하는 활성새린 잔기를 포함하는 리파제 구조부내에 위치한 잔기들을 함유하는 지질 접촉부 서열을 구성하는 및/ 또는 고리구조의 서열을 구성하는 하나 이상의 아미노산 잔기의 위치에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환, 삭제 또는 삽입된 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

39. 제38항에 있어서, 고리구조의 적어도 하나의 아미노산 잔기가 시스테인에 의해 치환되고, 및 적어도 하나의 다른 아미노산 잔기가 시스테인에 의해 치환되고, 두 시스테인 잔기가 서로서로에 대해 이황화물 결합을 형성하도록 위치되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

40. 제38항 또는 제39항에 있어서, 모 리파제가 미생물의 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

41. 제38항 내지 제40항중 어느 하나에 있어서, 모 리파제가 곰팡이의 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

42. 제41항에 있어서, 모 리파제가 Humicola 또는 Rhizomucor 균주로 부터 추출되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

43. 제42항에 있어서, 모 리파제가 Rhizomucor miehei 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

44. 제43항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체:

S114C + A90C

R86C + D61C;

S84C + D61C;
N87C + D61C;
Y60C + R78C; 또는
Y60C + N87C

45. 제43항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환되는 것을
특징으로 하는 리파제 변체:

I204V, T, S, A, G;
L208V, T, S, A, G;
V254V, T, S, A, G;
L255V, T, S, A, G;
L258V, T, S, A, G;
L267V, T, S, A, G;
F94L, T, K; 또는
F213L, T, K

46. 제43항에 있어서, 하기의 아미노산 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 리파제
변체:

I204T + L255T + L267T; 또는
L208T + V254T + L258T

47. 제46항에 있어서, 모 리파제가 Humicola lanuginosa 리파제인 것을 특징으로 하는
리파제 변체.

48. 제47항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환되는 것을
특징으로 하는 리파제 변체:

G61C + N88C;
G61C + E87C;
D62C + E87C;
D62C + S85C;
D62C + N88C; 또는
S116C + G91C

49. 제47항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환되는 것을
특징으로 하는 리파제 변체:

L93V,T,S,A,G;
 I90V,T,S,A,G;
 I86V,T,S,A,G;
 I202V,T,S,A,G;
 L206V,T,S,A,G;
 I255V,T,S,A,G;
 L259V,T,S,A,G;
 I265V,T,S,A,G;
 F95L,T,K; 또는
 F211L,T,K

50. 제49항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 하기와 같이 치환되는 것을

특징으로 하는 리파제 변체:

F95K;
 I86T;
 I90T;
 I255T;
 L259T;
 L206T; 또는
 L206T + I255T + L259T.

51. 제40항에 있어서, 모 리파제가 효모 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제 변체.

52. 제51항에 있어서, 모 리파제가 Candida 균주로 부터 추출되는 것을 특징으로

하는 리파제 변체.

53. 제40항에 있어서, 모 리파제가 세균의 리파제인 것을 특징으로 하는 리파제
 변체.

54. 제53항에 있어서, 모 리파제가 Pseudomonas 균주로 부터 추출되는 것을 특징으로

하는 리파제 변체.

55. 제 1항 내지 제54항중 어느 하나에 따른 리파제 변체를 암호화하는 DNA 서열을
 포함하는 DNA 구조체.

56. 제55항에 따른 DNA 구조체를 운반하는 재조합 발현벡터.

57. 제55항에 따른 DNA 구조체 또는 제56항에 따른 벡터로 형질전환된 세포.
58. 제57항에 있어서, 곰팡이 세포, 예컨대 A. niger, A. oryzae 또는 A. nidulans 따위의 속 Aspergillus 에 속하는 곰팡이세포; 효모세포, 예컨대 S. cerevisiae 따위의 Saccharomyces 군주에 속하는 효모세포, 또는 H. polymorpha 따위의 속 Hansenula 의 또는 P. pastoris 따위의 속 Phichia 의 메틸로트로픽 효모(methylotrophic yeast); 또는 세균세포, 예컨대 B. subtilis, 또는 B. lentus 따위의 Bacillus 군주에 속하는 세균 세포인 것을 특징으로 하는 세포.
59. 제57항에 있어서, 식물세포, 예컨대 Solanum tuberosum, 또는 Nicotiana tabacum 따위의 Solanaceae에 속하는 식물세포인 것을 특징으로 하는 세포.
60. 제59항에 따른 세포를 함유하는 식물.
61. 제 1항 내지 제54항중 어느 하나에 따른 리파제 변체의 제조방법에서, 제57항 내지 제59항중 어느 하나에 따른 세포, 또는 제58항에 따른 식물이 리파제 변체의 제조에 도움이 되는 조건하에서 배양 또는 생장되고 그 다음에 리파제 변체가 배양물 또는 식물체로 부터 회수되는 것을 특징으로 하는 리파제 변체 제조방법.
62. 제 1항 내지 제54항중 어느 하나에 따른 리파제 변체를 포함하는 세정제 첨가물에서, 선택적으로 비-살포성 과립, 안정화된 액체 또는 보호된 효소의 형태의 세정제 첨가물.
63. 제62항에 있어서, 첨가물 g당 효소 단백질을 0.02-200mg 포함하는 것을 특징으로 하는 세정제 첨가물.
64. 제62항 또는 제63항에 있어서, 부가적으로 프로테아제, 아밀라제, 펙옥시다제 및/또는 셀룰라제 따위의 다른 효소를 포함하는 것을 특징으로 하는 세정제 첨가물.

65. 제 1항 내지 제54항중 어느 하나에 따른 리파제 변체를 함유하는 세정제 조성물.

66. 제65항에 있어서, 부가적으로 프로테아제, 아밀라제, 펙옥시다제 및/ 또는 셀룰라제

따위의 다른 효소를 포함하는 것을 특징으로 하는 세정제 조성물.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.